

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von:

Diplom-Biochemiker Boris R. Hambsch  
aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:

# **Signaltransduktion der $\gamma$ -Protocadherine**

**Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Seeburg  
P.D. Dr. Klaus Scheffzek**

*für*

*meinen Sohn Yannik*

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt oder die Dissertation in dieser oder einer anderen Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, 11. Januar 2005

---

Boris R. Hambsch

## **Danksagung**

Hiermit bedanke ich mich bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Peter H. Seeburg für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Dr. Martin K. Schwarz für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit sowie die hervorragende und intensive Ausbildung.

P.D. Dr. Klaus Scheffzek für das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitwilligkeit diese zu begutachten.

Dr. Uli Krüth und vor allem Rainer Fischer (auf den ich mich immer verlassen kann) für die Korrektur dieser Arbeit.

Prof. Dr. Dean Madden, Prof. Dr. Eckhard Hoffmann, Dr. Pavel Osten, Dr. Valerie Grinevich, Dr. Rolf Sprengel, Dr. Miyoko Higuchi, Prof. Dr. Rolf Kemmler, Prof. Dr. Bart DeStrooper, Dr. Andreas Weidemann, Dr. Tobias Hartmann, Dr. Derja Shimshek, Dr. Volker Mack, Ali Cetin, Taehun Jin, und vor allem Sabine Grünwald für Material und fachliche Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit.

## Zusammenfassung

Gamma-Protocadherine ( $\gamma$ -pcdh), glykosilierte Typ I Transmembranproteine mit einer extrazellulären Domäne aus sechs Cadherin-artigen Modulen, sind vermutlich an Zelladhäsion beteiligt und in Säugetieren überlebensnotwendig. In der Maus gibt es 22  $\gamma$ -pcdh-Isoformen, deren Ektodomäne, Transmembrandomäne und ein kleiner Teil der intrazellulären Sequenz gemeinsam von variablen Exons mit eigenem Promotor kodiert werden. Am 3'-Ende dieses seriell angeordneten „Genklusters“ befinden sich drei, als konstante Region bezeichnete Exons, welche den Rest der zytoplasmatischen Sequenz, die invariante C-terminale Domäne ( $\gamma$ -ICD), kodieren. Durch „*cis*-Splicen“ der von diesem „Genkluster“ erzeugten Primärtranskripte können auf diese Weise Isoformen exprimiert werden, die alle die  $\gamma$ -ICD enthalten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit funktionellen Aspekten der  $\gamma$ -ICD. Es wurden gentechnisch veränderte Mäuse analysiert, welche nach Entfernung des konstanten Exon 1 ( $\Delta C1$ ) keine funktionelle  $\gamma$ -ICD mehr exprimieren können. Die neonatal sterbenden, homozygoten  $\Delta C1/\Delta C1$ -Tiere zeigten einen nahezu vollständigen Verlust der Lokusexpression. In den überlebenden, heterozygoten  $+\Delta C1$ -Mäusen wurden vom verbleibenden, intakten Allel Expressionsstärken von 50% der Wildtypmengen erwartet. Der Abfall der Transkript- und Proteinmengen auf 25% relativ zum Wildtyp war deshalb auffällig. Auffällig war auch die in Populationen von Nervenzellen auf Schnitten von adultem Maushirn beobachtete,  $\gamma$ -ICD-spezifische Färbung des Zellkerns. Dies lässt eine Funktion der  $\gamma$ -ICD bei der Genregulation im Zellkern vermuten. Für weitere Analysen wurden daher einfachere Zellkultursysteme verwendet, in welchen verschiedene, rekombinante  $\gamma$ -pcdh-Proteinvarianten transient exprimiert werden konnten. Zunächst wurde damit die intrazelluläre Verteilung der  $\gamma$ -pcdh in COS-1 Zellen bestimmt. Immunofluoreszenzfärbungen ergaben, dass die Verteilung der N- und C-terminalen  $\gamma$ -pcdh-Domänen unterschiedlich war und dass sich -wie in Neuronen- das  $\gamma$ -ICD enthaltende Fragment im Zellkern befand. Sowohl in transfizierten COS-1 Zellen, welche mit  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren behandelt wurden, als auch in  $\gamma$ -Sekretase-inaktiven PS1/2 K.O. Zellen fanden sich zwingende Belege für die Prozessierung der  $\gamma$ -pcdh durch „Regulierte Intramembran Proteolyse“ (RIP). Die intrazelluläre Domäne wird offenbar durch die  $\gamma$ -Sekretase freigesetzt und dann in den Zellkern importiert.

Analysen der Transkript- und Proteinmengen von transient  $^{myc}\gamma$ -ICD überexprimierenden HEK-293 Zellen zeigten eine Expressionssteigerung der endogenen Lokusexpression. Über zunehmende Luziferaseintensitäten von Reportervektoren ließ sich auch eine  $^{myc}\gamma$ -ICD-vermittelte Aktivitätssteigerung mehrerer  $\gamma$ -pcdh-Promotor ermitteln. Darüber hinaus ließ sich in SH-SY5Y Zellen durch die Hemmung der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität auch die endogene Menge an  $\gamma$ -pcdh reduzieren, so dass die  $\gamma$ -pcdh-Lokusexpression über RIP reguliert wird.

Diese Ergebnisse beschreiben den ersten Signaltransduktionsweg der  $\gamma$ -pcdh und identifizieren damit ein neues, wichtiges Substrat des  $\gamma$ -Sekretasekomplexes. Letztendlich bietet dieser Signaltransduktionsweg auch eine attraktive Erklärungsmöglichkeit für die in heterozygoten  $+\Delta C1$ -Mäusen beobachtete Reduktion der  $\gamma$ -pcdh-Transkript- und Proteinmengen.

## Summary

Gamma-protocadherins ( $\gamma$ -pcdhs), type I membrane-spanning glycoproteins with an extracellular domain of six cadherin-like modules are probably involved in cell adhesion and required for survival in the mammal. There are 22  $\gamma$ -pcdh-isoforms in the mouse, with the ectodomain, one transmembrane domain, and a small portion of the intracellular sequence together encoded by one variable exon, each with its own promoter. Three constant region exons are located at the 3' end of the tandemly arranged gene cluster which encode the invariant C-terminal domain ( $\gamma$ -ICD). *Cis*-splicing of the cluster's primary transcripts produces the  $\gamma$ -ICD containing isoforms. The present work focused on functional aspects of the  $\gamma$ -ICD. First, gene-targeted mice were analyzed, that can not express a functional  $\gamma$ -ICD, due to removal of constant exon 1 ( $\Delta CI$ ). Homozygous  $\Delta CI/\Delta CI$  animals showed almost complete loss of  $\gamma$ -pcdh locus expression and died shortly after birth. Remarkably, although 50% expression was expected from the presence of the remaining wild-type allele in viable  $+\Delta CI$  heterozygous mice,  $\gamma$ -pcdh transcript and protein levels dropped to 25% relative to wildtype. Notably, subsets of neurons in sections from adult mouse brain exhibited nuclear  $\gamma$ -ICD-staining. Thus,  $\gamma$ -ICD function might include transcriptional regulation in the nucleus. So, for further analysis, simpler cell culture systems were used and various recombinant  $\gamma$ -pcdh proteins were transiently expressed. First, the subcellular distribution of  $\gamma$ -pcdh was traced in COS-1 cells. Immunofluorescence staining revealed that N- and C-terminal portions of the  $\gamma$ -pcdhs were localized differently, with the  $\gamma$ -ICD containing fragment found in the nucleus, reminiscent of neurons. Both, transfected COS-1 cells treated with  $\gamma$ -secretase inhibitors, and  $\gamma$ -secretase inactive PS1/2 K.O. cells, made a strong case for  $\gamma$ -pcdhs undergoing „Regulated Intramembrane Proteolysis“ (RIP). Obviously, the intracellular domain is released by  $\gamma$ -secretase for import into the cell nucleus.

Upon transcript- and protein analysis in HEK-293 cells, transiently overexpressed <sup>myc</sup> $\gamma$ -ICD promotes  $\gamma$ -pcdh locus expression. Additionally, increased luciferase levels of reporter constructs demonstrated <sup>myc</sup> $\gamma$ -ICD-mediated, enhanced  $\gamma$ -pcdh promoter activity. Moreover, inhibition of  $\gamma$ -secretase function reduced endogenous  $\gamma$ -pcdh levels in SH-SY5Y cells, showing that  $\gamma$ -pcdh locus expression is regulated by RIP.

These results reveal a novel intracellular signaling pathway for  $\gamma$ -pcdhs and identify a novel vital target for the  $\gamma$ -secretase complex. Finally, this signalling pathway represents an attractive explanation for the observed reduction of  $\gamma$ -pcdh transcript- and protein levels in  $+\Delta CI$  heterozygous mice.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Protocadherine.....	2
1.2. Aufbau und Transkription des Protocadherin-“Genklusters”.....	3
1.3. Expression und Funktion der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Protocadherine.....	6
1.4. Die Entfernung des $\gamma$ -Protocadherin-“Genklusters” ist neonatal lethal	7
1.5. Expressionsprofil der $\alpha$ - und $\gamma$ -Protocadherine.....	8
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. Charakterisierung einer Deletion der invarianten C-terminalen Domäne der <math>\gamma</math>-Protocadherine in der Maus</b> .....	<b>9</b>
2.1.1. Die Deletion der invarianten C-terminalen Domäne der $\gamma$ -Protocadherine in der Maus.....	9
2.1.2. Genexpressionsanalysen verschiedener veränderter Mausallele.....	11
2.1.3. Proteinexpression verschiedener veränderter Mausallele.....	14
2.1.4. Antikörperfärbungen von Gehirngewebe verschiedener Genotypen.....	17
<b>2.2. Funktionelle Untersuchung der <math>\gamma</math>-ICD in transient exprimierenden Zellsystemen</b> .....	<b>18</b>
2.2.1. Antikörperfärbungen transient exprimierender COS-1 Zellen.....	18
2.2.2. Proteinexpressionsanalysen in transient transfizierten Zellkulturen.....	20
2.2.3. Quantifizierung intrinsischer $\gamma$ -Protocadherin-Transkriptmengen in transient transfizierten Zellkulturen durch „Real-Time PCR“.....	22
2.2.4. Die Transaktivierung der $\gamma$ -Protocadherin Promotoren durch die <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD	24
<b>2.3. Die Abspaltung der <math>\gamma</math>-ICD aufgrund <u>Regulierter Intramembran Proteolyse (RIP)</u></b> .....	<b>27</b>
2.3.1. Die proteolytische Prozessierung endogenen $\gamma$ -Protocadherin Proteins in murinem Gehirngewebe.....	27
2.3.2. Pharmakologische Untersuchungen in <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 exprimierenden COS-1 Kulturen.....	28
2.3.3. Proteinanalysen in <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 exprimierenden Presenilin 1&2 defizienten Zelllinien.....	32
2.3.4. Die Funktionalität eines mutmaßlichen $\gamma$ -Sekretase-Produkts.....	35
2.3.5. Quantifizierung intrinsischer $\gamma$ -Protocadherin Mengen in pharmakologisch behandelten SH-SY5Y Kulturen.....	37
<b>2.4. Dimerisierung der <math>\gamma</math>-Protocadherine</b> .....	<b>38</b>

<b>3. Diskussion</b> .....	<b>42</b>
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1. Material</b> .....	<b>50</b>
4.1.1. Besondere Apparate.....	50
4.1.2. Besondere Software.....	50
4.1.3. Besondere Reagenzien.....	50
4.1.4. Antiseren.....	51
4.1.5. Zelllinien.....	51
4.1.6. Mauslinien.....	51
4.1.7. Synthetische Oligonukleotide.....	52
4.1.8. Verwendete Konstrukte.....	53
<b>4.2. Methoden</b> .....	<b>56</b>
4.2.1. Methoden der Zellkultivierung.....	56
4.2.1.1. Kultivierung von Ohrfibroblasten.....	56
4.2.1.2. Kalziumphosphat-Transfektion von Zellkulturen.....	56
4.2.1.3. Pharmakologische Behandlung von Zellkulturen.....	57
4.2.1.4. Kultur, Transformation und Selektion von embryonalen Stammzellen.....	57
4.2.1.5. Immunfärbungen von Zellkulturen.....	58
4.2.2. Molekularbiologische Methoden.....	59
4.2.2.1. Isolierung von RNS.....	59
4.2.2.2. DNase Verdau.....	59
4.2.2.3. „Northern Blotting“.....	59
4.2.2.4. Reverse Transkription.....	60
4.2.2.5. cDNS-Quantifizierung durch “Real Time PCR“.....	60
4.2.3. Proteinanalyse.....	61
4.2.3.1. Zellyse.....	61
4.2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	61
4.2.3.3. Chemische Quervernetzung (Crosslinking).....	61
4.2.3.4. Depletieren von Antikörpern.....	62
4.2.3.5. Koimmunpräzipitation.....	62
4.2.3.6. Diskontinuierliche SDS-PAA-Gelelektrophorese.....	62
4.2.3.7. Proteintransfer und Antikörperdetektion (“Immunoblotting”).....	63
4.2.3.8. Entfernung von Protein Komplexen von PVDF Membranen (“Stripping”).....	63
4.2.3.9. Luziferasetest.....	63
<b>5. Anhang</b> .....	<b>65</b>
<b>5.1. Abkürzungen</b> .....	<b>65</b>
<b>5.2. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>66</b>



# 1. Einleitung

Sowohl angeborenes, als auch erworbenes Verhalten eines höheren Organismus wird durch die koordinierten und funktionellen Leistungen des zentralen Nervensystems (ZNS) ermöglicht. Die hierzu erforderlichen hohen Kapazitäten des ZNS werden durch den Aufbau komplexer neuronaler Netzwerke erreicht, welche sich über die selektiven Verknüpfungen von unterschiedlich differenzierten Nervenzellen organisieren. Die physische Interaktion einzelner Zellen findet dabei über, für ihren Verbund spezifische Zelladhäsionsmoleküle, wie z.B. den im ZNS exprimierten Mitgliedern der Cadherin Familie statt.

Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die in verschiedenen Formen in nahezu allen höheren Organismen zu finden sind. Als charakteristisches, strukturelles Merkmal weisen sie mehrere extrazelluläre Cadherin (EC)-Domänen mit einer Länge von jeweils ca. 110 Aminosäuren (AS) auf. Dieses Motiv ist in den verschiedenen Spezies strukturell stark konserviert und für die Ausbildung von Zell-Interaktionen verantwortlich. Anhand der Homologie dieser Aminosäuresequenzen lassen sich die Cadherine in verschiedene Untergruppen aufteilen:

- Klassische Cadherine
- Protocadherine
- Desmogleine/Desmocolline
- Cadherin-ähnliche Proteine

N-, E-, C-, VE-, R- und P-Cadherine zählen zu den so genannten „klassischen“ Cadherinen. Diese am besten charakterisierte Untergruppe besteht aus Typ I Transmembranproteinen mit 5 EC-Domänen, einer stark konservierten zytoplasmatischen Domäne und setzt sich durch ein dem Signalpeptid vorangestelltes Prosegment von anderen Mitgliedern der Cadherin Familie ab. Die jeweils N-terminale EC1-Domäne ist für die spezifische, homophile Interaktion von, an gegenüberliegenden Zelloberflächen exponierten Cadherinen verantwortlich [54]. Für die vermutlich bekanntesten und am besten untersuchten Vertreter dieser Untergruppe, die N- und E-Cadherine, konnte außerdem gezeigt werden, dass ein Konformationswechsel von einer globulären, ungeordneten, in eine gestreckte, stabförmige Struktur von einer Komplexierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die EC-Domänen abhängig ist [21]. Dieser Strukturwandel führt zur *cis*-Dimerisierung der Proteine, welche wiederum in eine Erhöhung ihrer Adhäsionskräfte mündet. Erst die gestreckte, *cis*-dimere Konformation erlaubt die Ausbildung starker, homophiler Bindungen an der Plasmamembran (*trans*-Dimere) [25][41], welche letztendlich, durch die reißverschlussartige Aggregation vieler Cadherine, zur sicheren Verankerung der Einzelzelle in ihrem spezifischen Verbund führt [41].

Die stark konservierte, zytoplasmatische Domäne der N- und E-Cadherine interagiert intrazellulär mit  $\gamma$ -,  $\beta$ -, und p120<sup>ctn</sup>-Catenin [11].  $\beta$ -Catenin verbindet die Cadherine über  $\alpha$ -Catenin mit Vinculin und anderen Proteinen des Zytoskeletts [56]. Die N- und E-Cadherine determinieren die Form und Gestalt einer Zelle somit nicht nur durch die extrazelluläre Adhäsion, sondern auch durch die Verankerung des Zytoskeletts.

$\beta$ -, und p120<sup>ctn</sup>-Catenin können unabhängig davon, nach ihrer Phosphorylierung durch intrazelluläre Tyrosinkinasen, auch von Cadherinen abdiffundieren und, über die Interaktion

mit dem Transkriptionsfaktor Lef-1, die Expression von E-Cadherin im Zellkern reduzieren [R]. N- und E-Cadherine sind auf diese Weise an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt.

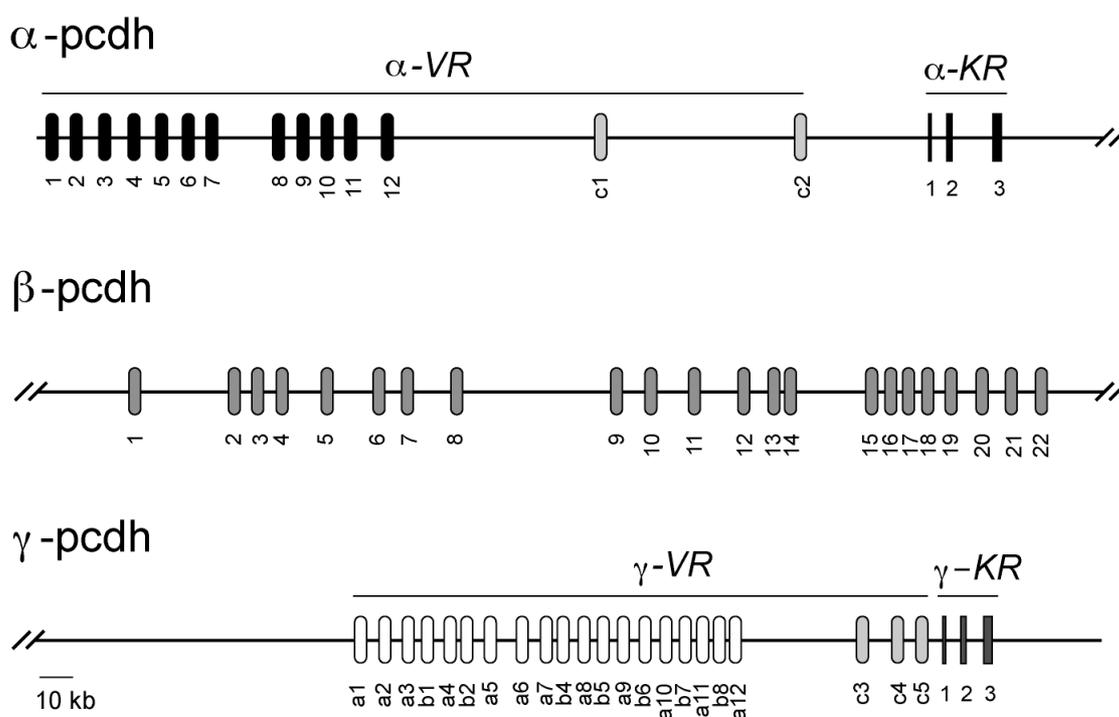
Eine alternative Funktion der zytoplasmatischen Domäne ist die für N-Cadherin beschriebene, zytosolische Komplexierung des Transkriptionsaktivators „CREB Binding Protein“ (CBP), welche zu dessen proteasomalen Abbau führt [19]. Viele physiologische Prozesse, wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose werden von dieser indirekten Hemmung des Transkriptionsfaktors CREB beeinflusst. Der durch die zytoplasmatische Domäne vermittelte Abbau von CBP kann nur stattfinden, wenn diese zuvor durch „Regulierte Inamembran Proteolyse“ (RIP) [52] von N-Cadherin abgetrennt wurde. Bei diesem, u.a. auch für E-Cadherin [18] beschriebenen Vorgang handelt es sich um eine regulierte Abfolge von Proteolysesritten, in welchen zunächst die extrazelluläre Domäne von Typ I Transmembranproteinen durch so genannte Matrixproteasen entfernt wird. Das in der Plasmamembran verbleibende Fragment dient als Substrat für den, in der, für Proteolysen eigentlich ungeeigneten, hydrophoben Plasmamembran operierenden  $\gamma$ -Sekretasekomplex. Durch ihn kann die C-terminale Domäne von N-Cadherin anschließend abgetrennt und in das Zytosol abgegeben werden. Der 400-600 kDa umfassende  $\gamma$ -Sekretasekomplex setzt sich aus den Proteinen Nicastrin, APH-1, Pen-2 und den Presenilinen zusammen [4]. Das katalytische Zentrum wird an der Kontaktstelle zweier aneinander grenzender Presenilinproteine durch zwei konservierte, intramembranständige Aspartylreste gebildet. Die Schnittstellenpräzision und die Substratspezifität der  $\gamma$ -Sekretase sind jedoch gering. Daher konnten für eine stetig wachsende Zahl von Substraten, zu denen das „Amyloid Precursor Protein“ (APP) [49] und Notch als die Bekanntesten zählen, unterschiedlich prozessierte, zytoplasmatische Fragmente beschrieben werden [48].

### 1.1. Protocadherine

Durch den Einsatz degenerierter, mit Sequenzen der EC-Domänen paarender Primer, gelang es Shintaro Suzuki 1993 die ersten Mitglieder dieser Untergruppe der Cadherinfamilie zu identifizieren [32]. Da er die dabei erhaltenen Sequenzen aufgrund ihrer Homologien für phylogenetisch früh auftretende, evolutionär konservierte Cadherinmotive hielt, bezeichnete er sie nach dem griechischen Wort „Protos“ -das Erste- als Protocadherine (pcdhs). Tatsächlich konnte aber bis heute weder in *Drosophila melanogaster* noch *C. Elegans* ein zu *Vertebraten* orthologes pcdh identifiziert werden, was für deren späteres evolutionäres Auftreten spricht. Mit wenigen Ausnahmen (Flamingo, Fat [53],  $\mu$ -pcdh und pcdh 19 [7]) handelt es sich bei den pcdhs um Typ I Transmembranproteine mit 6-7 EC-Domänen. Im Gegensatz zu den übrigen Cadherinen werden deren, für die extrazelluläre Domäne kodierenden DNS-Sequenzen aber nicht von Introns unterbrochen, sondern aus einem ungewöhnlich großen Exon gebildet. Allen pcdhs gemeinsam sind auch die in den EC-Domänen konservierten Aminosäuresequenzen DXDXGXN, AXDXGXPXL und VXVXVXSXNDNAPXF [54]. Außerdem weisen die pcdhs untypische, zytoplasmatische Domänen auf, welche keine Ähnlichkeiten mit den übrigen Cadherinen zeigen.

## 1.2. Aufbau und Transkription des Protocadherin-“Genklusters”

Die ca. 22 bekannte Mitglieder zählende Gruppe der *pcdhs* wurde 1999 durch die Entdeckung eines ortholog stark konservierten [12][40][45] “Genklusters” auf dem humanen Chromosom 5q31 bzw. murinen Chromosom 18q12 um 53 humane bzw. 58 murine *pcdh*-Isoformen erweitert [54]. Die sequentiell angeordneten, kodierenden Sequenzen des “Genklusters” lassen sich nach ihrer Sequenzhomologie und Organisation in 3 Klassen unterteilen, in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -*pcdhs*. In jeder Klasse werden die extrazelluläre-, transmembrane- und Teile der zytoplasmatischen Domäne jedes *pcdh*s von einem einzigen 2,4 kb-Exon kodiert, welches in einem als “variable Region” (VR) bezeichneten, genomischen Bereich (siehe Abbildung 1.1.) liegt. Die C-terminalen Sequenzen der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -*pcdhs* werden jeweils von 3 Exons kodiert, welche von zwei großen Introns unterbrochen in einem als konstante Region (KR) bezeichneten Bereich am 3’Ende der jeweiligen VR liegen [54]. Der Genlocus der  $\beta$ -*pcdh*s besitzt keine Sequenzen für ein gemeinsames, konserviertes C-terminales Ende [45].



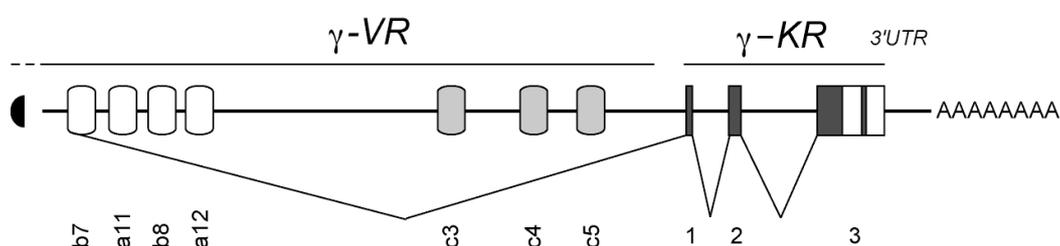
**Abbildung 1.1.: Organisation des 900 kb umfassenden, murinen *pcdh* “Genklusters” nach [42]. Die Exons der VR sind mit ovalen Symbolen, die Exons der KR sind mit quadratischen Symbolen gekennzeichnet. Die  $\alpha$ -VR umfasst 14, die  $\beta$ -VR 22 und die  $\gamma$ -VR ebenfalls 22 Exons.**

5' zum Translationsstart jedes variablen Exons gelegen, befinden sich evolutionär stark konservierte Sequenzen. Durch komparative Analysen intergenischer Regionen konnte gezeigt werden, dass diese zwischen Mensch und Maus ortholog stärker konserviert sind, als die paralogenen Sequenzen im selben Organismus [55]. Das Auftreten von, ca. 20-50 Nukleotide umfassenden „CpG-Inseln“, welche in ca. 50 % aller Säugerpromotoren und auch in diesen Sequenzen zu finden sind, sprach für deren Beteiligung an einer Transkriptionskontrolle. Tatsächlich konnte beispielsweise für  $\alpha$ -*pcdh* 6 gezeigt werden, dass

dessen Expression durch die Hypermethylierung der betreffenden CpG-Inselsequenzen faktisch zum Erliegen kam, bei einer Hypomethylierung aber unbeeinflusst blieb [42].

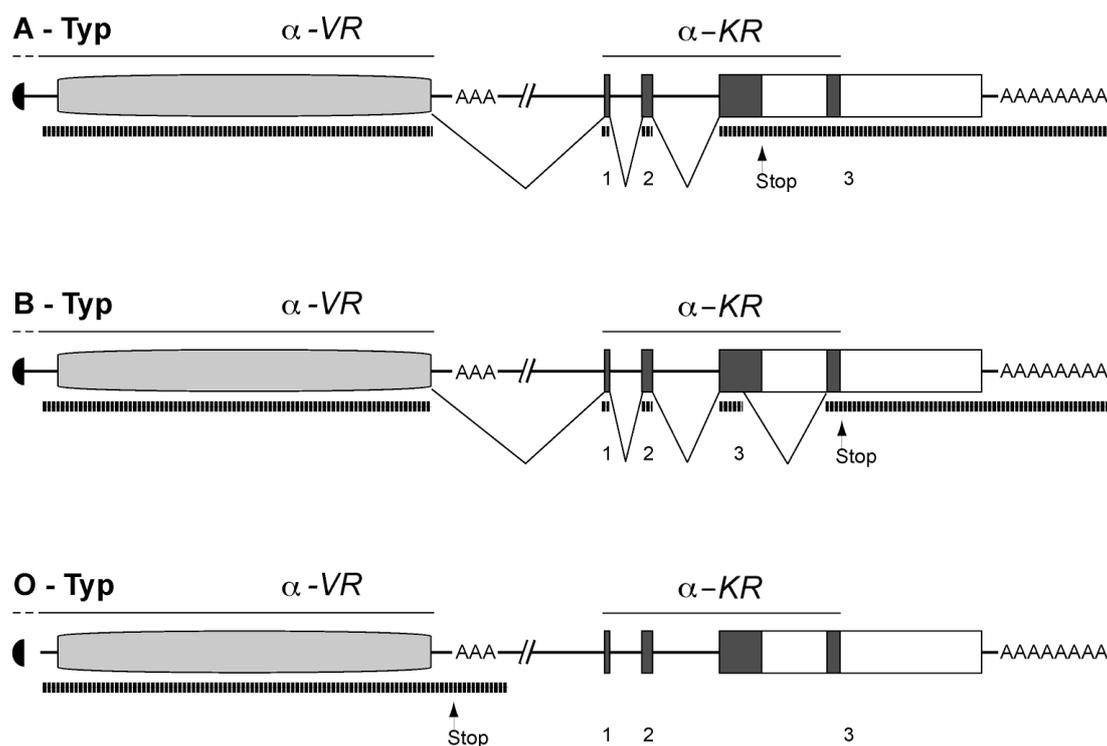
Ca. 200 bp 5' zum Translationsstart jedes variablen Exons, befindet sich außerdem das Konservierte Sequenz Element (KSE). Diese ca. 22 bp langen Sequenzen haben alle die Tetranukleotidabfolge CGCT gemeinsam und liegen ebenfalls innerhalb der evolutionär stark konservierten, intronischen pcdh-Sequenzen. Da die 5'-Enden aller untersuchten pcdh-Transkripte außerdem vor dem 3'-Ende dieser KSE zu finden waren, lag es nahe, dass es sich bei diesem Motiv um eine Promotorsequenz handeln könnte. Einen Beleg dafür erbrachte u.a. eine Deletion der KSE, welche die Expression eines unter der Kontrolle der entsprechenden  $\gamma$ -pcdh b7-Promotorsequenz stehenden Reporters zum Erliegen brachte [42]. Derart [42][47] konnte gezeigt werden, dass jedes variable Exon seinen individuellen Promotor besitzt, dessen Transkription unabhängig von den umliegenden pcdhs spezifisch reguliert werden kann.

Da sich die Organisation der pcdh- und der Immunglobulin-„genkluster“ sehr gleicht, wurde erwartet, dass, ähnlich den bei der Entstehung von Antikörperdiversitäten involvierten Mechanismen, auch die Variabilität der pcdh-Genprodukte erhöht werden kann. Eine derartige Fülle verschiedener Zelladhäsionsproteine hätte über die selektive Verknüpfung von Nervenzellen die molekulare Grundlage für die Entstehung komplexer neuronaler Netzwerke bedeuten können. Untersuchungen ergaben jedoch, dass, zur Erzeugung individueller  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -pcdh kodierender Transkripte, jedes VR-Exon nach der Transkription immer nur an das erste KR-Exon seiner Klasse gespleißt wird. Folglich weisen alle Mitglieder einer Klasse am 3'Ende die gleichen konservierten Sequenzen auf. Der dem zugrunde liegende Mechanismus wird als alternatives *cis*-Spleißen bezeichnet. Ausgehend vom individuellen Promotor wird hier ein bis zum Ende des „Klusters“ der entsprechenden Klasse reichendes Transkript erzeugt, aus dem die nicht mehr benötigten Sequenzen letztendlich wieder ausgeschnitten werden müssen (siehe Abbildung 1.2.). Intra- und interalleles alternatives *trans*-Spleißen, das durch die Erzeugung von  $\alpha$ -VR-Exon/ $\gamma$ -KR-Exon-Chimären und *vice versa* eine Erhöhung der pcdh-Diversität mit sich geführt hätte, konnte nur zu einem geringen Prozentsatz (>0,2%) beobachtet werden und scheint eher auf Prozessierungsfehler des Spliciosoms zu beruhen [42][47].



**Abbildung 1.2.: Model nach [42]. Jedes variable Exon besitzt seinen eigenen Promotor. Nur das 5'-endständige variable Exon eines primären Transkripts wird durch *cis*-Spleißen mit dem ersten konstanten Exon seiner Klasse verknüpft. Die 7-Methyl-Guanosin-Kappe ist als Halbkreis dargestellt.**

Für die kodierenden Sequenzen der auch als Cadherin Related Neuronal Rezeptor (CNR) bezeichneten  $\alpha$ -pcdh-Genklasse wurden außerdem weitere alternative Spleißvorgänge in den KR-Exons beschrieben. Diese resultieren in als A, B und 0 (Null)-Typ bezeichneten  $\alpha$ -pcdh-Isoformen (siehe Abbildung 1.3.) [40]. So kann bei korrekt an das VR-Exon angehängten KR-Exons im Exon 3 eine zusätzliche Spleißstelle auftreten. Dadurch werden Teile der kodierenden Sequenzen entfernt, so dass 3' im Exon gelegene, im ungespleißten Transkript untranslatiert verbleibende Sequenzen, nun translatiert werden. Das gespleißte Transkript kodiert dann ein 105 Aminosäuren umfassendes, als B-Typ bezeichnetes C-terminales Ende. Das als A-Typ bezeichnete C-terminale Ende des ungespleißten Transkripts weist dagegen 152 Aminosäuren auf. Beide Typen unterscheiden sich nicht in den von den KR-Exons 1, 2 und Teilen von 3 translatierten, ersten 83 Aminosäuren. Weiterhin wurden auch spleißfreie, als O-Typ bezeichnete, Genprodukte beschrieben, deren Transkripte 3' zum VR-Exon lokalisierte, intronische Sequenzen enthalten. Die „konservierte“ C-terminale Domäne des resultierenden Proteins umfasst hier nur 12 Aminosäuren. Funktionell ist es deshalb möglicherweise redundant zu den ebenfalls spleißfreien  $\beta$ -pcdhs.



**Abbildung 1.3.: Alternatives Spleißen des  $\alpha$ -pcdh C-terminalen Endes. Der B-Typ unterscheidet sich vom A-Typ durch zusätzliches Spleißen im KR-Exon 3. Im Gegensatz dazu findet beim (Null) O-Typ überhaupt kein Spleißen von der VR- auf die KR-Exons statt. Die den Genlokus unterlaufenden, gestreiften Balken markieren die Abmessungen des resultierenden Transkripts. Die translationalen Stop-Sequenzen sind in jedem Typ verzeichnet [40].**

### 1.3. Expression und Funktion der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Protocadherine

Die Genprodukte des pcdh “Genklusters” sind allesamt Typ I Transmembranproteine von ca. 900-950 Aminosäuren Länge mit 6 EC-Domänen (siehe Abbildung 1.4). Ihre Aminosäuresequenzen, insbesondere die der konservierten C-terminalen und EC2&3-Domänen, sind ortholog noch stärker konserviert, als ihre Nukleotidsequenzen [40][45], was auf eine evolutionär konservierte Funktion schließen lässt. Die durch die EC-Domänen der pcdhs erzielten homophilen Adhäsionskräfte scheinen jedoch gering zu sein, weswegen es sich bei dieser Funktion offenbar nicht um eine Stärkung der physischen Verbindungen von Zellen zu handeln scheint. Für AXPC- und PAPC-pcdhs gemachte Beobachtungen zeigen jedoch eine alternative Möglichkeit. Hier konnte durch die Entfernung der zytoplasmatischen Domäne eine Steigerung der Adhäsionskraft dargestellt werden [15]. Analog dazu, könnte bei den “geklusterten” pcdhs ebenfalls eine vorausgehende, bislang unbekannte, strukturelle Veränderung erst die Voraussetzungen für starke homophile Interaktionen schaffen.

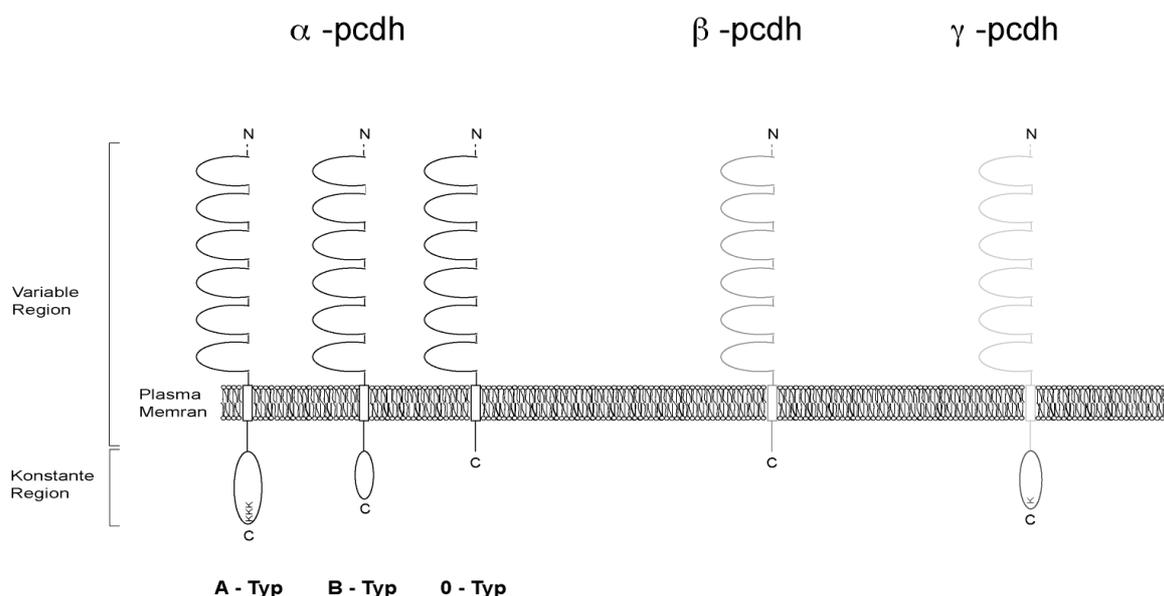


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung aller  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -pcdh-Isoformen

Innerhalb der verschiedenen Klassen [40][45], sowie innerhalb der verschiedenen Unterklassen der  $\gamma$ -pcdhs (12xA, 7xB, 3xC [12]), sind hauptsächlich die EC 4, 5 & 6-, die transmembranen- und kurzen zytoplasmatischen Domänen paralog stark konserviert. Die EC-Domänen 1-3 zeigen innerhalb einer Spezies dagegen eine hohe Diversität ihrer Aminosäuresequenzen. Dies impliziert die Vorstellung von, hochspezifischen homophilen Interaktionen zwischen individuellen pcdhs, welche –wie bei den klassischen Cadherinen– durch diese Domänen vermittelt werden könnten. Im Gegensatz zu den “ungeklusterten” pcdhs, welche meist in funktionell, lokal begrenzten Schaltkreisen, wie diskreten (anatomischen) Nuklei oder Laminae exprimiert werden [40] und deshalb funktionell vermutlich auch an ihrem Aufbau beteiligt sind, finden sich  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -pcdhs hingegen

punktuell, aber nicht funktionell korreliert über das gesamte ZNS verstreut. Hier sind die individuellen „geklusterte“ pcdhs in einem großen Teil aller Neuronen und Interneuronen nachweisbar. Eine individuelle Nervenzelle exponiert aber immer nur einzelne pcdhs des gesamten „Genklusters“ an ihrer Oberfläche und kann vermutlich nur mit solchen Zellen interagieren, welche dieselbe Auswahl exprimiert. Bei der Betrachtung spezifischer Kombinationen mehrerer pcdh fällt nun auf, dass diese in kaum überlappenden Mustern exprimiert werden [10][13][27]. Die Bestimmung, welche funktionellen Schaltkreise eine distinkte Gruppe von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -pcdhs eventuell determiniert, ist damit erschwert. Eine selektive Verknüpfung von Nervenzellen durch spezifische Kombinationen mehrerer pcdh als molekulare Grundlage für die Entstehung komplexer neuronaler Netzwerke ist prinzipiell aber möglich.

#### **1.4. Die Entfernung des $\gamma$ -Protocadherin-„Genklusters“ ist neonatal lethal [46]**

Die vollständige Entfernung eines Genlokus aus dem Genom von Mäusen resultiert oft in drastischen physiologischen und phänotypischen Veränderungen, aus denen auf die Funktion des entsprechenden Genprodukts geschlossen werden kann. Dem entsprechend ist auch die Entfernung einzelner Klassen des pcdh-„Genklusters“ eine Möglichkeit deren funktionelle Aspekte zu beleuchten. Für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -pcdh konnte bisher keine derartige Deletion beschrieben werden. Die komplette gentechnische Entfernung des 200 kb umfassenden  $\gamma$ -pcdh „Genklusters“ aus dem murinen Genom resultiert aber in deutlichen phänotypischen Veränderungen. Zu den auffälligsten zählen schwere Beeinträchtigungen der Motorkoordination, beeinträchtigte Atmung, gekrümmte Haltung, Verweigerung der Nahrungsaufnahme und der frühe Tod neugeborener Tiere. Fehlbildungen der inneren Organe sind hingegen nicht erkennbar. Im späten Stadium der Embryonalentwicklung zeigen die Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren aber eine in ihrem Durchmesser reduzierte Wirbelsäule. Auch Neurogenese, Neuronenmigration, Axonenwachstum und Synapsenbildung zeigen zunächst keine Auffälligkeiten. Wie weitere Untersuchungen ergaben, weisen die mutierten Mäuse aber in der grauen Substanz des Rückenmarks einen exzessiven Verlust von Interneuronen durch Apoptose auf. Diese resultiert auch in einer deutlichen Reduktion der Synapsendichte. Die Defekte der mutierten Maus sind also eine Folge der Degeneration spezifischer neuronaler Zellpopulationen. Warum bereits vernetzte und korrekt platzierte aber  $\gamma$ -pcdh defiziente Interneuronen degenerieren, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

### 1.5. Expressionsprofil der $\alpha$ - und $\gamma$ -Protocadherine

Wie in 1.3. ausgeführt, finden sich die pcdhs punktuell, aber nicht funktionell korreliert über das gesamte ZNS verstreut. Versuche, Aussagen über die differentielle Expression der verschiedenen Klassen der „geklusterten“ pcdhs in unterschiedlichen Regionen des ZNS zu treffen, wurden mit *in-situ* Färbungen von Maus- und Rattenhirn unternommen. So finden sich  $\alpha$ - und  $\gamma$ -pcdhs gleichermaßen diffus in Neocortex und *bulbus olfactorius*, im Cerebellum hingegen spezifisch in Granula- und Purkinjezellen exprimiert [10][13]. Im Thalamus, dem Rückenmark [10] und *colliculus inferior* [46] scheinen die  $\gamma$ -pcdhs mit einer größeren Intensität als die  $\alpha$ -pcdhs exprimiert zu werden [13]. Im Hippocampus schließlich sind zwar beide pcdhs in den Granulazellen des *gyrus dentatus* nachweisbar, doch während die Expression der  $\alpha$ -pcdhs stark in der CA1- und schwach in der CA3-Region zu sein scheint, verhält es sich bei den  $\gamma$ -pcdhs genau umgekehrt.

In Kulturen embryonaler Hippocampalneuronen zeigen sich die  $\gamma$ -Protocadherine nach 30 Tagen in 100% aller Interneuronen, dort jedoch nicht an inhibitorischen Synapsen. In entsprechenden Pyramidalneuronen hingegen lassen sich die  $\gamma$ -pcdhs an exzitatorischen Synapsen, kolokalisiert mit PSD95, markieren [27]. Letzteres lässt vermuten, dass pcdhs synaptisch lokalisiert sind. Untermuert wird dies durch Immunogoldfärbungen bei welchen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -pcdhs mit spezifischen Antikörpern post- und präsynaptisch, sowie in tubulovesikulären Organellen nachgewiesen werden konnten [27]. Eine spezifische Rolle der pcdh bei der Stärkung synaptischer Kontakte liegt also im Bereich des möglichen.

## 2. Ergebnisse

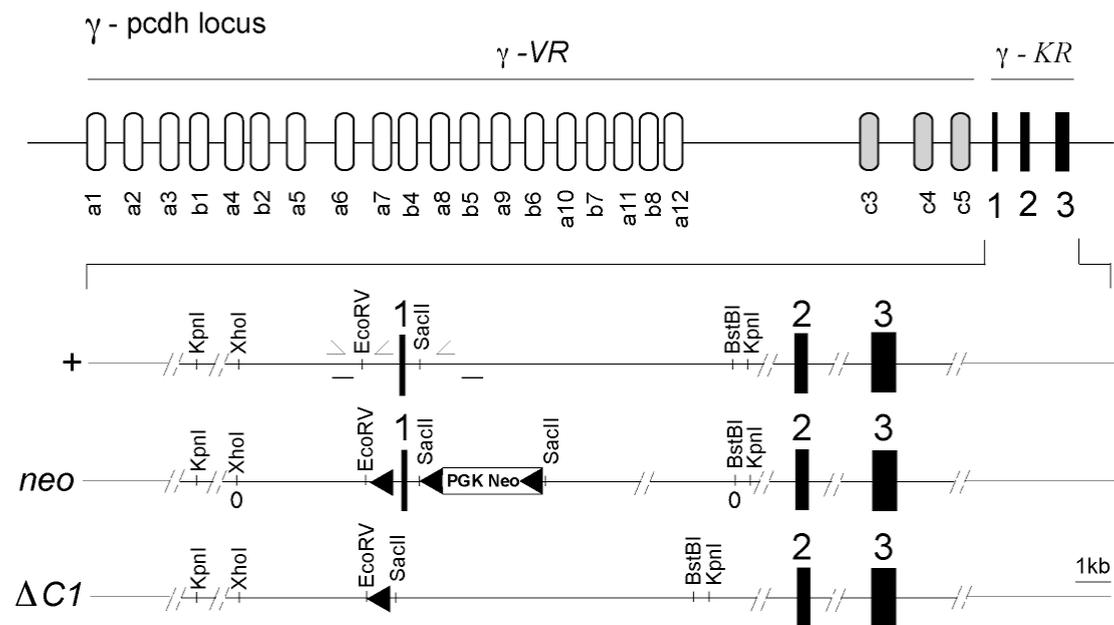
### 2.1. Charakterisierung einer Deletion der invarianten C-terminalen Domäne der $\gamma$ -Protocadherine in der Maus

#### 2.1.1. Die Deletion der invarianten C-terminalen Domäne der $\gamma$ -Protocadherine in der Maus

Die invariante C-terminale Domäne (ICD) der 22 murinen  $\gamma$ -Protocadherine ( $\gamma$ -pcdhs) wird von den Exons 1-3 der konstanten Region (KR) kodiert, welche am 3'Ende des „Genklusters“ auf Chromosom 18q12 lokalisiert sind. Die Aminosäuresequenz ist mit zwei Aminosäuren Unterschied zur humanen Sequenz ortholog sehr stark konserviert, was auf eine evolutionär konservierte Funktion schließen lässt. Um diese Funktion und ihre physiologische Bedeutung für den Organismus *in vivo* analysieren zu können, wurde die  $\gamma$ -ICD in Mäusen gentechnisch entfernt.

Hierzu wurde der „ploxP NEO-3  $\gamma$ -pcdh CE1-targeting“ Vektor (siehe 4.1.8.) in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) aus 129/SVx129/SVj-Mausblastozysten (siehe 4.1.5.) transfiziert. Einzelne ES Zellklone wurden mit Hilfe von Neomycinresistenz auf die erfolgreiche Integration des Vektors in das Genom selektioniert (siehe 4.2.1.4.). Bei Klonen mit einer korrekten Integration lagern sich zunächst Regionen des Mausgenoms mit gleichen Sequenzen des Vektors aneinander. Bei nachfolgender homologen Rekombination lassen sich dann neue DNS-Sequenzen an definierten Stellen in das Genom integrieren. Die homologe Rekombination wurde durch „Southern blots“ verifiziert. Auf diese Weise wurden 450 bp 5'intronisch zum  $\gamma$ -pcdh konstanten Exon 1 ein LoxP-Element und ca. 1 kb 3' zum Exon 1 eine von LoxP-Elementen flankierte, so genannte Neo-Kassette (Neo) in das Mausgenom integriert (siehe Neo-Allel in Abbildung 2.1.1.). Ein LoxP-Element besteht aus einer assymmetrischen, 8 Nukleotide umfassenden Region, welche von zwei invertierten 13-Nukleotid-„repeats“ flankiert wird. Die in gegenläufiger Orientierung plazierte Neo-Kassette kodiert die unter der Kontrolle des Phosphoglycerat-Kinase-Promotors stehende Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase. Die Expression dieses Enzyms erlaubt rekombinierten ES-Zellklonen das, an der 18S-rRNS der 40S Untereinheit eukaryotischer Ribosomen hemmende Neomycin zu inaktivieren und damit ihr Überleben im entsprechenden Selektionsmedium zu sichern.

Nach der Injektion von korrekt rekombinierten ES-Zellen in Mausblastozysten und deren intrauterine Implantation in pseudoschwangere C57BL/6-Mausweibchen wurden Nachkommen mit dem höchsten Chimärismus auf Keimbahngängigkeit getestet und dazu mit C57BL/6-Mäusen verpaart. Hieraus gingen  $\gamma$ -pcdh<sup>+NEO</sup>-Tiere hervor. Aus diesen phänotypisch unauffälligen, heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+NEO</sup>-Tieren wurden dann entweder homozygote  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO/NEO</sup>-Mäuse gezüchtet, oder, um Exon 1 deletierte ( $\Delta$ C1), heterozygote  $\gamma$ -pcdh<sup>+ $\Delta$ C1</sup>-Tiere zu erhalten, mit Cre-Deleter-Mäusen [36] gekreuzt (siehe  $\Delta$ C1-Allel in Abbildung 2.1.1.).



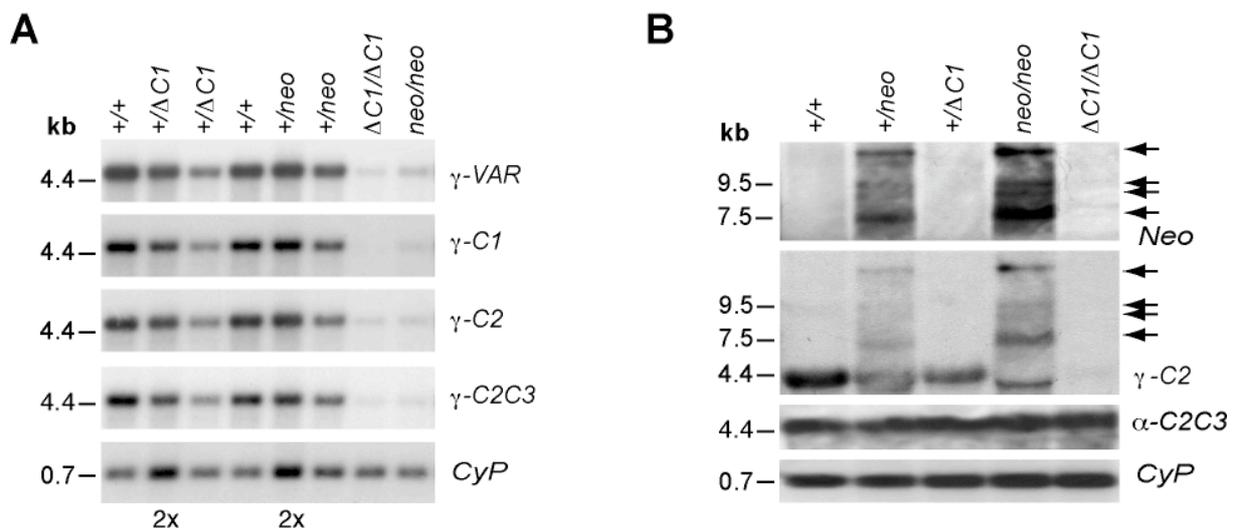
**Abbildung 2.1.1.: Gentechnische Veränderung des murinen  $\gamma$ -pcdh-Allels. Der  $\gamma$ -pcdh-Lokus mit 22 Exons der VR (ovale Symbole) und den Exons 1-3 der KR (gefüllte Quadrate) ist schematisch dargestellt. Aus der Integration von *LoxP*-Elementen (Dreiecke) und einer Neo-Kassette in intronische Sequenzen durch homologe Rekombination resultiert das Neo-Allel. Die offenen Kreise markieren die Abmessungen des *ploxP* NEO-3  $\gamma$ -pcdh CE1-„targeting“ Vektors. Das  $\Delta C1$ -Allel wird nach der Entfernung der Neo-Kassette und des Exon 1 der KR durch die Cre-Rekombinase erzeugt.**

Im  $\gamma$ -pcdh <sup>$\Delta C1$</sup> -Allel konnten mit Hilfe des Bakteriophagen P1 Cre/*LoxP*-Rekombinations-systems der Cre-Deleter-Mäuse [14][29] alle zwischen den *LoxP*-Elementen lokalisierten DNS-Sequenzen, also das Exon 1 der KR, die Neo-Kassette und intronische Abschnitte mit Spleißakzeptorsequenzen, erfolgreich aus dem murinen Genom entfernt werden. Diese Rekombination ist durch die zeitliche und räumliche Expression der Cre-Rekombinase (Cre) determiniert und sollte in den verwendeten Cre-Deleter-Mausstämmen während der späten Embryonalentwicklung in allen Zellen des Organismus stattfinden. Je ein Cre-Protein bindet dabei an eine der beiden flankierenden 13-Nukleotid-„repeats“ der *LoxP*-Elemente. Befinden sich zwei *LoxP*-Elemente in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft, kommt es unter der konzertierten Aktion von 4 Cre-Proteinen zur überkreuzten Spaltung und Neuknüpfung von DNS-Strängen (Holliday-Typ-Intermediate), welche in unserem Falle die Deletion von ca. 1,5 kb zur Folge hatte. In den Transkripten des resultierenden  $\gamma$ -pcdh <sup>$\Delta C1$</sup> -Allels werden die Exons der VR nicht mehr auf Exon 1, sondern direkt auf Exon 2 oder 3 der KR gespleißt. Daraus resultiert eine Verschiebung des Leserasters der kodierenden Sequenz, so dass vom manipulierten Allel lediglich eine  $\gamma$ -ICD von nur noch 4 bzw 17 Aminosäuren Länge (siehe Abbildung 2.1.2.) exprimiert wird, welche ihre mutmaßlichen physiologischen Funktionen nicht mehr ausführen können sollte.



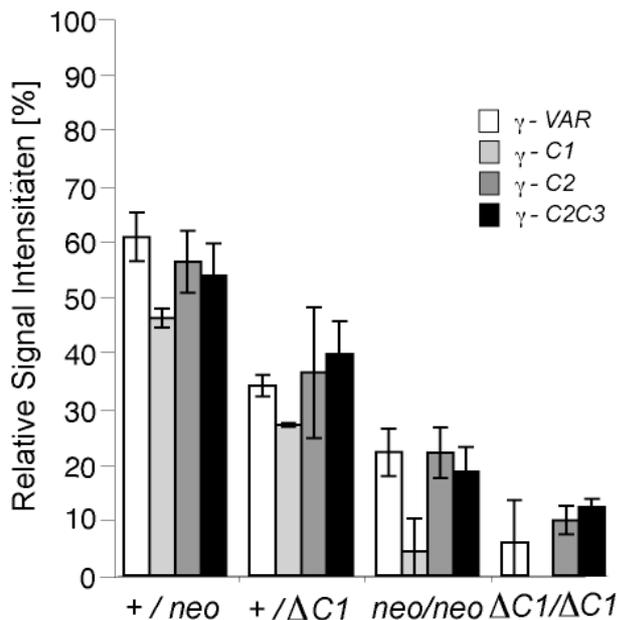
unbeeinflusst, wie die identischen Signalstärken der  $\alpha$ -C2C3-Sonde, gerichtet gegen die A-Typ Transkriptsequenzen der KR-Exons 2&3, zeigen. Damit kann sowohl ein Einfluss der  $\gamma$ -pcdh auf die Expression der  $\alpha$ -pcdh, als auch ein, bereits in anderen Arbeiten als unbedeutend erachtetes [42], alternatives *trans*-Spleißen, zur Erzeugung von  $\gamma/\alpha$ -Chimären (siehe 1.3.) in den hier analysierten Tieren ausgeschlossen werden.

Das zusätzliche Auftreten von Signalen bei Transkriptgrößen von ca. 7, 12 und 21 kb in der mRNA von  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Tieren (siehe Markierung in in Abbildung 2.1.3.) erreichen bei homozygoten Tieren ca. die doppelte Signalstärke von heterozygoten Tieren. Dies deutet darauf hin, dass es aufgrund der intronischen Lokalisation der Neokassette zu Störungen beim Spleißen und damit zur Anhäufung fehlgespleißter mRNA kommt. Eine Neo-Sonde, gerichtet gegen die in diesen Mäusen noch vorhandene Neo-Kassette zeigt auf den entsprechenden „Northern blots“ identische Signalgrößen und Intensitäten. Diese Spleißhemmungen könnten ein Grund für die mit allen  $\gamma$ -pcdh-Sonden beobachteten, stark reduzierten Expressionsmengen der  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-mRNA sein.



**Abbildung 2.1.3.:** „Northern blot“-Analyse der mRNA (B) und PolyA+mRNA (A) aus neonatalem Gehirngewebe verschiedener Genotypen. Die RNS wurde mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert, welche gegen verschiedene Regionen der  $\gamma$ -pcdh-,  $\alpha$ -pcdh- und Neo-Transkripte gerichtet waren (Die Neo-Kassette enthaltenden Signale sind mit einem Pfeil gekennzeichnet). Die Vergleichbarkeit der aufgetragenen RNS-Mengen wurden mit einer Sonde gegen Cyclophilin überprüft.

Um Aussagen über das Ausmaß der Beeinträchtigungen der Expression manipulierter Allele in den verschiedenen Genotypen treffen zu können, wurden nun die Signalintensitäten der „Northern blot“-Analysen densitometrisch quantifiziert. Schwankungen in den Auftragsmengen der einzelnen Sonden konnten dabei mit einer gegen Cyclophilin-2 mRNA gerichteten radioaktiv markierten Cy-Sonde detektiert und anschließend rechnerisch normalisiert werden. Die so erhaltenen Werte von jeweils drei Tieren jedes Genotyps wurden gemittelt und prozentual relativ zum Wildtyp in Abbildung 2.1.4. als Histogramm dargestellt.



**Abbildung 2.1.4.: Quantifizierungen der Signalintensitäten der „Northern blot“-Analysen. Die prozentual relativ zum Wildtyp angegebenen Signalstärken wurden jeweils aus drei Tieren jedes Genotyps gemittelt und Schwankungen der Auftragsmenge mit der Cyclophilin-Sonde detektiert und angeglichen. Die Standardabweichungen sind als Balken vermerkt.**

Aus den Quantifizierungen der Signalintensitäten ist in den verschiedenen Genotypen kein signifikanter Unterschied der  $\gamma$ -VAR- zu den  $\gamma$ -C2- oder  $\gamma$ -C2C3-Sonden ersichtlich. Damit kann in den Transkripten beider manipulierter Allele weitgehend von einem, weiter oben diskutiertem, direkten Spleißen der VR-Exons auf das KR-Exon 3 abgesehen werden. Wäre in einer gewissen Menge von Transkripten kein KR-Exon 2 mehr vorhanden, so sollte diese mit der  $\gamma$ -C2-Sonde nicht mehr detektierbar sein. Die Präsenz des KR-Exon 3 in derartigen Transkripten ließe sich aber von der  $\gamma$ -C2C3-Sonde noch erkennen und würde zu einer Signalzunahme führen. Die Signalintensität der  $\gamma$ -C2C3-Sonde wäre dann gegenüber der Intensität der  $\gamma$ -C2-Sonde erhöht.

Mit der  $\gamma$ -C1<sup>N37</sup>-Sonde sind in homozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>ΔC1/ΔC1</sup>-Tieren erwartungsgemäß keine KR-Exon 1 haltigen Transkripte mehr detektierbar, was dessen komplette Entfernung im gesamten Mausgehirn widerspiegelt. Mit den  $\gamma$ -VAR-,  $\gamma$ -C2-, und  $\gamma$ -C2C3-Sonden lässt sich durch eine Bestimmung der Expressionsstärke von ca. 10% (SD±5; N=9) relativ zu den Wildtyp- (+) Transkripten in diesen Tieren die Residualexpression eines  $\gamma$ -pcdh<sup>ΔC1</sup>-Allels auf ca. 5% beziffern. Die Expression des  $\gamma$ -pcdh<sup>ΔC1</sup>-Allels ist demnach stark beeinträchtigt.

In heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ΔC1</sup>-Mäusen wären dementsprechend mit den  $\gamma$ -VAR-,  $\gamma$ -C2C3- und  $\gamma$ -C2-Sonden Intensitäten von max. 55% (rel. zu den +Transkripten) zu erwarten, da sich hier die Expressionsstärken eines +, und eines  $\gamma$ -pcdh<sup>ΔC1</sup>-Allels addieren sollten. Überraschenderweise liegen in diesen Mäusen die Transkriptmengen aber lediglich bei ~ 40% (SD±5; N=9). Noch ausgeprägter ist diese Diskrepanz bei Verwendung der  $\gamma$ -C1<sup>N37</sup>-Sonde, welche lediglich noch eine Signalstärke von ~ 30% (SD±10; N=3) aufweist. Die Expression des +Allels scheint in diesen Tieren also ebenfalls stark beeinträchtigt zu sein. Trotzdem sind 30% der  $\gamma$ -pcdh+Mengen offensichtlich ausreichend, das Überleben der heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ΔC1</sup>-Tiere ohne phänotypische Auffälligkeiten zu sichern.

Wie bereits erwähnt, sind die Expressionsmengen des  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allels, vermutlich aufgrund des, durch die intronisch lokalisierte *Neo*-Kassette verursachten Fehlspleißens (siehe oben), stark reduziert. Aus den Quantifizierungen der Signalintensitäten homozygoter  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO/NEO</sup>-Tiere wurden mit der  $\gamma$ -C1<sup>N37</sup>-Sonde Transkriptmengen von ca. 5% (SD±5; N=3) und mit den  $\gamma$ -VAR-,  $\gamma$ -C2C3- und  $\gamma$ -C2-Sonden Transkriptmengen von ca. 20% (SD±5; N=9) gemessen. Diese Mengen sind zum Überleben der entsprechenden Tiere offensichtlich nicht ausreichend. Sie spiegeln außerdem wieder, dass ein gewisser Anteil, der vom  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allel erzeugten Transkripte kein KR-Exon 1 mehr enthält, also fehlgespleißt wird.

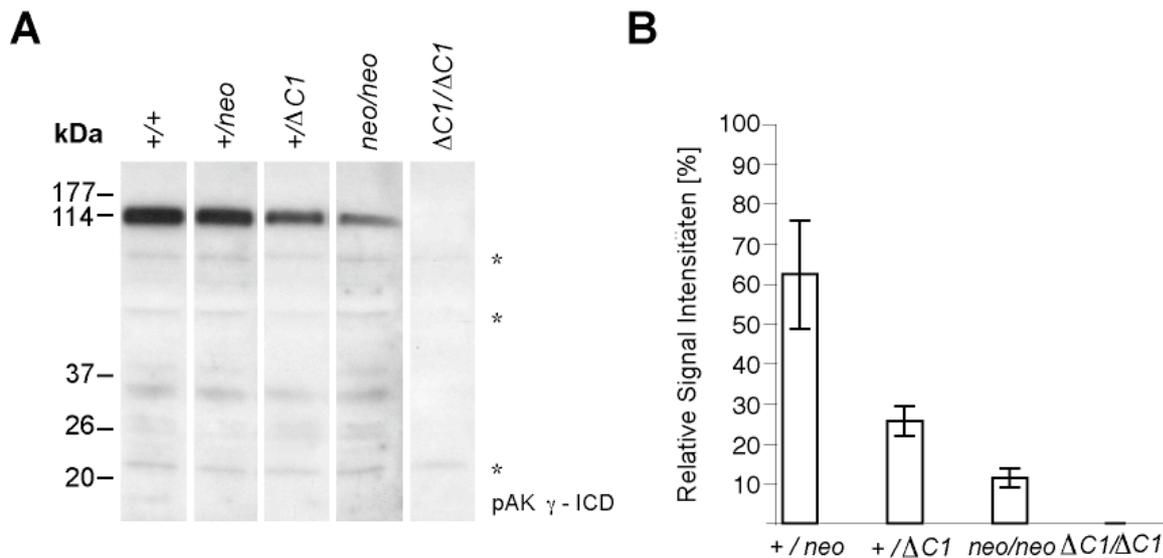
Die aus heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+NEO</sup>-Tieren mit den  $\gamma$ -VAR-,  $\gamma$ -C2C3- und  $\gamma$ -C2-Sonden erhaltenen Signale scheinen mit 60% (SD±10; N=9) der +Expression keine Beeinträchtigung des +Allels aufzuweisen. Sie scheinen die Intensitäten, die aus dem Zusammenspiel von einem intakten + und dem  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allel zu erwarten gewesen wären, zu bestätigen. Die mit der  $\gamma$ -C1<sup>N37</sup>-Sonde erhaltenen Signalintensitäten von ca. 50% (SD±5; N=3) weisen aber offenbar auch hier auf einen gewissen Anteil, an, vom  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allel erzeugten, fehlgespleißten Transkripten hin, welcher kein KR-Exon 1 mehr enthält.

### 2.1.3. Proteinexpression verschiedener veränderter Mausallele

Um die durch „Northern blot“ gemachten Beobachtungen einer in den heterozygoten Tieren beeinträchtigten Expression des +Allels zu überprüfen, wurde aus neonatalem Gehirngewebe aller Genotypen Proteinlysate gewonnen und durch „Western blot“ (WB) analysiert. Das „geblottete“  $\gamma$ -pcdh-Protein wurde dabei mit einem gegen die gesamte  $\gamma$ -ICD gerichteten Antiserum (pAK  $\gamma$ -ICD) als eine, bei ca. 114 kDa migrierende Doppelbande detektiert (siehe Abbildung 2.1.5.A.). Um Aussagen über die Expressionsmengen manipulierter Allele in den verschiedenen Genotypen treffen zu können, wurden auch hier die Signalintensitäten densitometrisch quantifiziert und Schwankungen in den Auftragsmengen der einzelnen Sonden durch Vergleich mit den Signalintensitäten eines GAPDH-Antikörpers rechnerisch normalisiert.

Zunächst bestätigen die „WB“-Analysen die durch „Northern blot“ gemachte Beobachtung, dass die Expression manipulierter Allele in heterozygoten Tieren stark reduziert und in homozygoten Tieren nahezu eingestellt wurde (siehe Abbildung 2.1.5.A.). Erwartungsgemäß findet sich auch in den Proteinlysaten der homozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>ΔC1/ΔC1</sup>-Tiere kein  $\gamma$ -pcdh mehr, was zunächst die ausnahmslose Rekombination des  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allels im gesamten Gehirngewebe, aber auch umgekehrt die Spezifität des mit dem pAK  $\gamma$ -ICD detektierten 114 kDa-Signals bestätigt.

Die durch Quantifizierung der in heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+ΔC1</sup>-Tieren erhaltenen  $\gamma$ -pcdh-Proteinmengen (siehe Abbildung 2.1.5.B.) sind mit einer Signalstärke von ca. 30% (SD±5; N=3) relativ zu den +Mengen, mit dem, mit der  $\gamma$ -C1<sup>N37</sup>-Sonde im „Northern blot“ erzielten Wert identisch. Die Beeinträchtigung der Expression des +Allels in diesen Tieren schlägt sich also auch auf die Proteinmengen nieder.

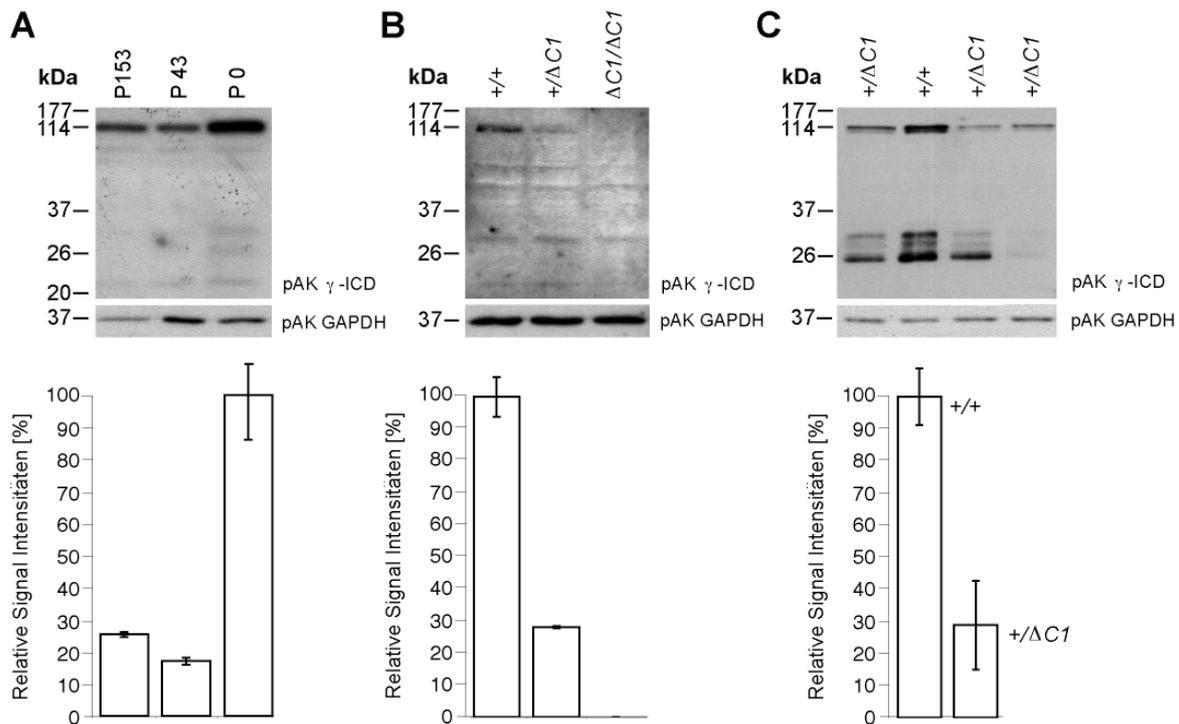


**Abbildung 2.1.5.A.:** „Western blot“-Analyse der aus neonatalem Gehirngewebe verschiedener Genotypen gewonnenen Proteinlysate. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdhs aus 6  $\mu$ g Gesamtprotein kam ein gegen die  $\gamma$ -ICD gerichteter Antikörper zur Anwendung. Unspezifische Signale des Antikörpers sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit aufgetragener Proteinmengen wurde ein Antikörper gegen GAPDH verwendet.

**B.:** Quantifizierungen der Signalintensitäten der „WB“-Analysen. Die prozentual relativ zum Wildtyp angegebenen Signalstärken wurden jeweils aus drei Tieren jedes Genotyps gemittelt und Schwankungen der Auftragsmenge mit der GAPDH-Antikörper detektiert und angeglichen. Die Standardabweichungen sind als Balken vermerkt.

Die in der homozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO/NEO</sup>-Maus erhaltenen Proteinmengen liegen bei ca. 10% (SD $\pm$ 5; N=3) der + Expression und bestätigten damit ebenfalls die bei der Analyse der entsprechenden Transkriptmengen gemachten Beobachtungen.

Die für die heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+NEO</sup>-Tiere erhaltenen Signalintensitäten von ca. 65% (SD $\pm$ 15; N=3) des +Proteins lassen sich nur schlecht mit dem mit der  $\gamma$ -C1<sup>N37</sup>-Sonde gemessenen Wert von 50% (SD $\pm$ 5; N=3) vereinbaren. Die Expression korreliert aber gut mit den durch die  $\gamma$ -VAR-,  $\gamma$ -C2C3- und  $\gamma$ -C2-Sonden erhaltenen Signalintensitäten von 60% (SD $\pm$ 10; N=3). Wie bereits erwähnt, werden von diesen Sonden auch die fehlerhaft gespleißten Transkripte erkannt, welche in einer verstümmelten  $\gamma$ -ICD resultieren. Da das entsprechende Protein allerdings nicht vom pAK  $\gamma$ -ICD erkannt wird (und zur Detektion auch kein geeigneter Antikörper zur Verfügung steht), kann es nicht direkt zu den gemessenen Signalintensitäten beigetragen haben. Die, im Vergleich zur Transkription, erhöhten Proteinmengen heterozygoter  $\gamma$ -pcdh<sup>+NEO</sup>-Tiere lassen sich somit entweder aus der Ungenauigkeit der verwendeten Quantifizierungsmethode, oder durch die hohe Standardabweichung (SD $\pm$ 15; N=3) und damit durch Schwankungen in den Expressionsmengen verschiedener Tiere erklären.



**Abbildung 2.1.6.A.:** „Western blot“-Analyse der aus Gehirngewebe von Mäusen verschiedenen Alters gewonnenen Proteinlysate. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdh aus 6  $\mu$ g Gesamtprotein kam ein gegen die  $\gamma$ -ICD gerichteter Antikörper zur Anwendung. Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit aufgetragener Proteinmengen wurde ein Antikörper gegen GAPDH verwendet. Die Quantifizierungen der Signalintensitäten wurden entsprechend gegen die GAPDH-Intensitäten normiert; individuelle Standardabweichungen sind als Balken graphisch wiedergegeben. **B.+C.:** Analog wurde auch in der Auswertung der Proteinlysate von neonatalem Rückenmarksgewebe und P0-Ohrfibroblastenkulturen verfahren.

Die Ähnlichkeit des Phänotyps der homozygoten Mäuse beider manipulierter Allele zur  $\gamma$ -pcdh-Gesamtloкус Deletion [46] lässt sich also tatsächlich auf die geringe Expression der  $\gamma$ -pcdh <sup>$\Delta$ C1</sup>- und  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allele zurückführen. Da die einzig beschriebene anatomische Abnormalität in den  $\gamma$ -pcdh-Gesamtloкус deletierten Mäusen eine Reduktion der Interneuronenpopulation in der grauen Substanz des Rückenmarks ist, wurden zunächst auch die Proteinlysate des Rückenmarks verschiedener Genotypen durch „WB“ analysiert. Wie aus Abbildung 2.1.6.B. ersichtlich, lassen sich die für das Gehirngewebe erhaltenen Befunde auf das Rückenmark übertragen. In den Proteinlysaten der homozygoten  $\gamma$ -pcdh <sup>$\Delta$ C1/ $\Delta$ C1</sup>-Tiere findet sich kein endogenes  $\gamma$ -pcdh und die aus heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ C1</sup>-Tieren erhaltenen  $\gamma$ -pcdh-Proteinmengen weisen ebenfalls eine Signalstärke von ca. 30% (N=1) auf. Der Grund für diese Korrelation zwischen Größe der Interneuronenpopulation und  $\gamma$ -pcdh-Expressionsstärke ist unbekannt.

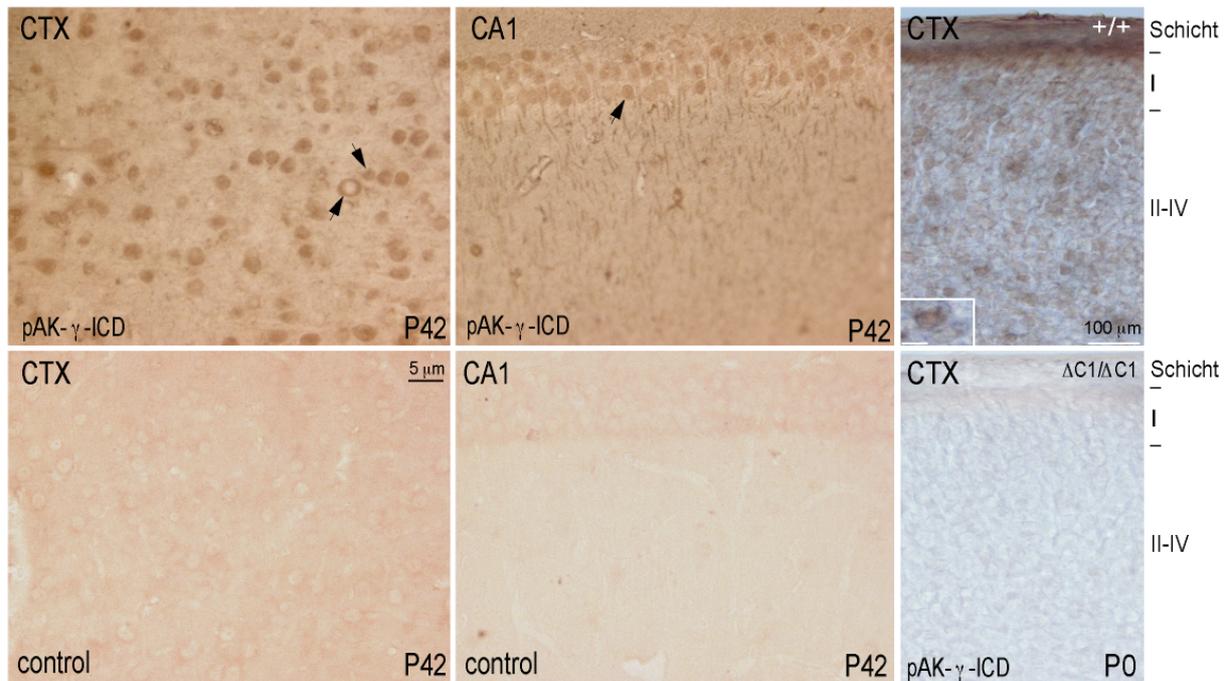
Da allerdings auch in den Proteinlysaten von heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ C1</sup>-P0-Ohrfibroblastenkulturen (Kultivierung für 10 d; siehe Abbildung 2.1.6.C.) Signalstärken von 30% (SD $\pm$ 5; N=3) endogenem  $\gamma$ -pcdh detektiert wurden, scheint die Beeinträchtigung der Expression des +Allels in diesen Tieren eine, auch in anderen  $\gamma$ -pcdh exprimierenden Geweben und nicht nur auf das ZNS beschränkte Erscheinung zu sein.

Interessanterweise sterben homozygote Mäuse außerdem zu einem Zeitpunkt an dem die  $\gamma$ -pcdh-Expression deutlich erhöht ist. Bereits in früheren Arbeiten wurde mit einem gegen die konservierte zytoplasmatische Region gerichteten Antikörper gezeigt, dass sich das  $\gamma$ -pcdh-Expressionsniveau während der Embryonalentwicklung bis zur Geburt steigert und postnatal nach 5 d wieder abnimmt [10]. „WB“-Analysen von C57B1/6NCrl-Mäusen verschiedenen Alters (siehe Abbildung 2.1.6.A.) zeigen in unmittelbar postnatal gewonnenen Lysaten, verglichen zu entsprechenden Lysaten älterer Tiere ebenfalls 5-fach erhöhte  $\gamma$ -pcdh-Proteinmengen. Weiterhin wurde für embryonale hippocampale Neuronen aus Ratten beschrieben, dass sich innerhalb von 26 d in Kultur die Zahl der  $\gamma$ -pcdh-Protein exprimierenden Zellen nahezu halbiert [27]. Möglicherweise hängt die Abnahme des  $\gamma$ -pcdh-Expressionsniveaus im Maushirn also mit einer Verminderung der  $\gamma$ -pcdh exprimierenden Nervenzellen zusammen.

#### 2.1.4. Antikörperfärbungen von Gehirngewebe verschiedener Genotypen

Um zu überprüfen, ob die Abnahme der  $\gamma$ -pcdh-Proteinmengen in adulten Tieren mit einer Verminderung der Expression in allen Nervenzellen oder einer drastischen Verminderung der Gesamtzahl an  $\gamma$ -pcdh exprimierenden Zellen zusammenhängt, sollte die Expression im Vorderhirngewebe von neugeborenen und 42 d alten Mäusen miteinander verglichen werden. Koronalschnitte von Cortex und der hippocampalen CA1-Regionen wurden hierzu mittels pAK  $\gamma$ -ICD gefärbt. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität in neugeborenen Mäusen dienten Gewebsschnitte der homozygoten  $\gamma$ -pcdh <sup>$\Delta$ C1/ $\Delta$ C1</sup>-Tiere. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität in adulten Mäusen wurde der Antikörper mit einem Überschuss seines Antigens inkubiert, pelletiert und das entsprechend depletierte Serum (siehe 4.2.3.4.) zur Gewebefärbung eingesetzt.

Leider erwies sich die Färbung der Gewebsschnitte neugeborener Tiere als schwierig und blieb selbst nach einer Verstärkung durch Ni<sup>2+</sup>-Ionen nur diffus (siehe Abbildung 2.1.6.A.). Quantitative Aussagen über eine Verminderung der Anzahl  $\gamma$ -pcdh exprimierender Nervenzellen waren deshalb nicht möglich. Interessanterweise zeigten in adulten Tieren aber die meisten  $\gamma$ -pcdh positiven Neuronen neben einer zytoplasmatischen Färbung auch eine starke Färbung der Kerne, was bei einem Zelladhäsionsprotein nicht zu erwarten war. Dies erforderte eine weitere Untersuchung der subzellulären Verteilung der  $\gamma$ -pcdh.

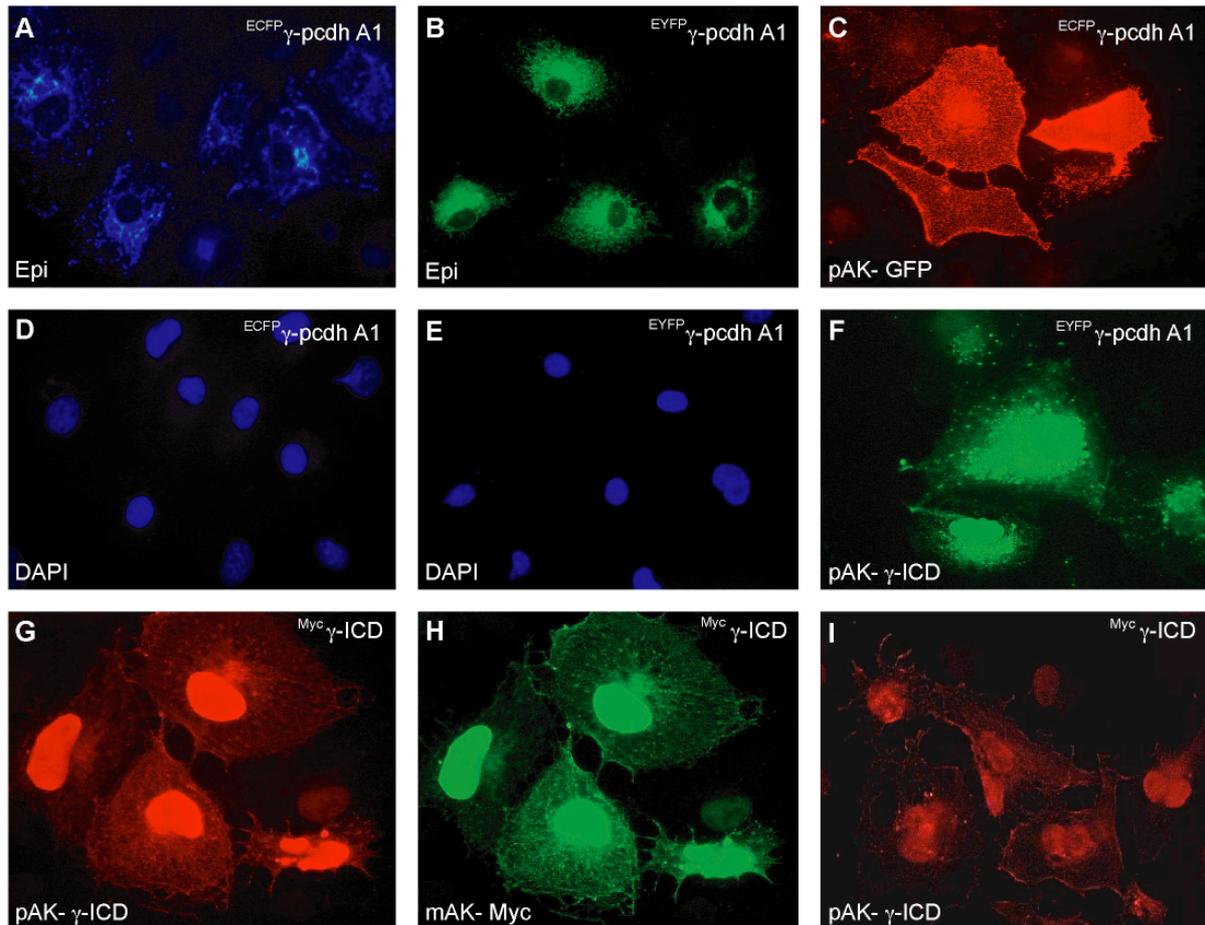


**Abbildung 2.1.6.:** Antikörperfärbungen koronaler Vibratonschnitte der Cortex- (CTX) und der hippocampalen CA1 (CA1)-Regionen murinen Vorderhirngewebes. Die histologischen Untersuchungen wurden mit einem gegen die  $\gamma$ -ICD gerichteten Antikörper durchgeführt und in den neugeborenen Tieren (P0) mit  $\text{Ni}^{2+}$  verstärkt [A]. Die Abbildungen sind mit einer 40-fachen Vergrößerung gezeigt (mit freundlicher Unterstützung von Valery Grinevich).

## 2.2. Funktionelle Untersuchung der $\gamma$ -ICD in transient exprimierenden Zellsystemen

### 2.2.1. Antikörperfärbungen transient exprimierender COS-1 Zellen

Da uns zur Untersuchung der subzellulären Verteilung der  $\gamma$ -pcdh kein gegen die EC-Domänen gerichteter Antikörper zur Verfügung steht, wurden zunächst COS-1 Zellen mit N-terminal EYFP oder ECFP fusionierten, rekombinanten  $\gamma$ -pcdh A1 Konstrukten transient transfiziert, permeabilisiert und zur Markierung der Nuklei mit DAPI (siehe 4.2.3.4.) behandelt. Die bei entsprechenden Wellenlängen angeregten Fusionsproteine zeigten eine hauptsächlich zytosolische und an distinkten Punkten konzentrierte Lokalisation der Fluoreszenz. In den mit DAPI gefärbten Kernen hingegen war kaum Fluoreszenz detektierbar (siehe Abbildung 2.2.1.B und C). Färbungen mit verschiedenen GFP-spezifischen Antikörpern von identisch transfizierten, aber unpermeabilisierten COS-1 Zellen, wiesen ebenfalls eine über die gesamte Zelloberfläche verteilte und an distinkten Punkten konzentrierte Lokalisation der Signale auf, was beweist, dass EYFP oder ECFP markiertes  $\gamma$ -pcdh A1-Protein zu einem großen Teil ektopisch exprimiert und effektiv in die Plasmamembran inseriert wird (siehe Abbildung 2.2.1.D.).



**Abbildung 2.2.1.:** Mikroskopische Aufnahmen von transient mit EYFP  $\gamma$ -pcdh A1 (A, D, F), ECFP  $\gamma$ -pcdh A1 (B, C, E), Myc  $\gamma$ -pcdh ICD (G, H) transfizierten und untransfizierten (I) COS-1 Zellkulturen. Die Anregung der N-terminal mit einem Fluorophor fusionierten Proteine erfolgte bei Wellenlängen von 405(B) bzw. 514(A) nm, die Emission bei 485(B) bzw. 545(A) nm. Der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper wurde mit einem bei 488 nm (F, H, I) und die gegen das Myc-Epitop (G) und GFP (C) gerichteten Antikörper mit einem bei 595 nm anregbaren, konjugierten Spezies spezifischen (sekundären) Antikörper visualisiert. DAPI wurde bei 358 nm (D, E) angeregt und emittiert bei 461 nm. Zur spezifischen Markierung von ektopisch exprimierten Proteinen blieben die in D gezeigten COS-1 Zellen unpermeabilisiert.

Bei der Verwendung des pAK  $\gamma$ -ICD zur Fluoreszenzfärbung permeabilisierter Zellen ergibt sich hingegen, sowohl in mit <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1, als auch in untransfizierten COS-1 Kulturen (siehe Abbildung 2.2.1.F und I) ein abweichendes Bild. Nur ein Teil des detektierten Signals liegt hier in zytosolisch lokalisierten Anballungen vor. Ein größerer Teil exogenen, wie endogenen  $\gamma$ -pcdh-Proteins befindet sich im Nukleus. Diese stark divergierende Lokalisation der N-terminalen wie C-terminalen  $\gamma$ -pcdh-Bestandteile spricht dafür, dass ein die ICD beinhaltender Teil der  $\gamma$ -pcdhs offensichtlich abgetrennt und in den Kern importiert wird. Zwar wäre auch die unabhängige Produktion eines nur die  $\gamma$ -ICD umfassenden Proteins denkbar, doch bisherige Untersuchungen sprechen gegen diese These [42][47]. Der Befund eines Kernimports wird außerdem noch durch das Auftreten einer theoretisch vorhergesagten Nukleus-Lokalisations-Sequenz (NLS, siehe Abbildung 2.1.2.) am C-terminalen Ende der

$\gamma$ -pcdhs und des unter 2.1.4. beschriebenen starken Kernsignals in  $\gamma$ -ICD-spezifischen Antikörperfärbungen murinen Gehirngewebes adulter Tiere unterstützt.

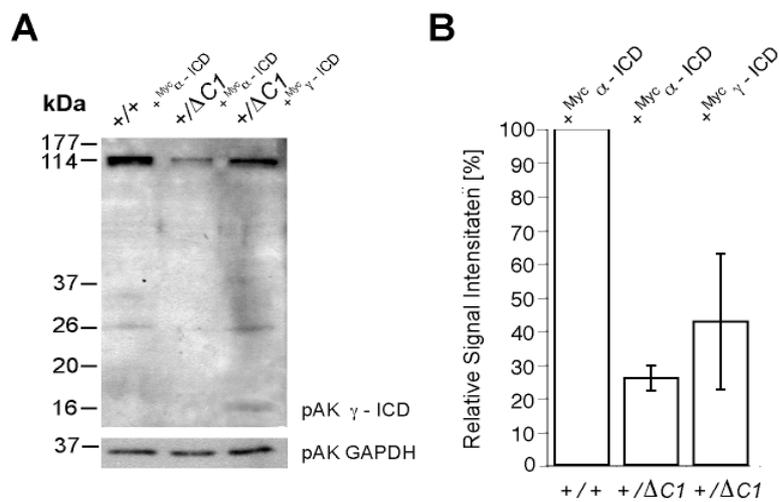
Um den Import eines die ICD enthaltenden  $\gamma$ -pcdh-Fragments in den Kern tatsächlich zu verifizieren, wurden COS-1 Zellkulturen mit der N-terminal an ein Myc-Epitop fusionierten  $\gamma$ -ICD transfiziert, permeabilisiert, und sowohl mit einem Myc-spezifischen Antikörper, als auch mit dem pAK  $\gamma$ -ICD gefärbt. Wie aus Abbildung 2.2.1.H. ersichtlich, befindet sich das Myc-spezifische Signal größtenteils im Kern und lässt sich daher mit der mit dem pAK  $\gamma$ -ICD detektierten Fluoreszenz in Deckung bringen (Abbildung 2.2.1.G.). Das Auftreten zusätzlicher, zytosolisch lokalisierter Signale in Abbildung 2.2.1.H ist auf die Detektion endogenen  $\gamma$ -pcdhs zurückzuführen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unprozessiertes  $\gamma$ -pcdh im mikroskopischen Bild zytosolisch und in distinkten Punkten ektopisch exprimiert vorliegt, während die  $\gamma$ -ICD, vermutlich nach einer proteolytischen Prozessierung, in das Zytoplasma abgegeben und in den Nukleus importiert wird.

## 2.2.2. Proteinexpressionsanalysen in transient transfizierten Zellkulturen

Der Import der freigesetzten  $\gamma$ -ICD in den Zellkern und die Reduktion der Signalstärken endogenen  $\gamma$ -pcdhs in den Proteinlysaten von heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ C1</sup>-Mäusen auf  $\sim 30\%$  sprechen für die Vermutung, dass möglicherweise die freigesetzte  $\gamma$ -ICD eine, auf die eigene Expression stimulierend wirkende Komponente sein könnte. Das würde bedeuten, dass in diesen Tieren zum Erreichen des vollen +Transkriptumfangs ungenügend hohe Mengen an freigesetzter  $\gamma$ -ICD vorhanden sind. Zur Überprüfung dieser These wurden die unter 2.1.3. beschriebenen P0-Ohrfibroblastenkulturen heterozygoter  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ C1</sup>-Tiere mit dem <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD-Konstrukt transfiziert. Erwartet wurde eine Erhöhung der endogenen  $\gamma$ -pcdh-Proteinmengen auf 50% der +Signalintensitäten in den transfizierten Kulturen. Dies käme einer vollständigen Restauration der beeinträchtigten +Expression und damit einer Identifikation der  $\gamma$ -ICD als genregulatorische Komponente der  $\gamma$ -pcdhs gleich. Zur Kontrolle wurde sowohl ein Teil der +, als auch der aus heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ C1</sup>-Tieren stammenden Ohrfibroblastenkulturen mit der <sup>Myc</sup> $\alpha$ -ICD transfiziert und deren Proteinlysate zusammen mit den aus mit der <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD transfizierten Kulturen gewonnenen Proben auf „WBs“ analysiert.

Wie aus Abbildung 2.2.2.A. ersichtlich, liegt in den Lysaten der Ohrfibroblastenkulturen das bei 16 kDa durch die exogene <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD generierte Signal aber nur knapp über der Detektionsgrenze, d.h. die Transfektionsrate war hier sehr gering und außerdem großen Schwankungen unterworfen. Entsprechend sind auch die aus den Quantifizierungen der Signalintensitäten erhaltenen, endogenen  $\gamma$ -pcdh-Proteinmengen stark von einander abweichend, nicht signifikant von mit dem <sup>Myc</sup> $\alpha$ -ICD transfizierten Kulturen verschieden und damit leider nur als Tendenz zu bewerten. So steigen die Proteinmengen endogener  $\gamma$ -pcdhs in P0-Ohrfibroblastenkulturen heterozygoter  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ C1</sup>-Mäuse nach der Transfektion mit der <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD von  $\sim 30$  auf  $\sim 45\%$  (SD $\pm 20$ ; N=3).



**Abbildung 2.2.2.A.:** „Western blot“-Analyse der aus transient transfizierten P0-Ohrfibroblastenkulturen gewonnenen Proteinlysate. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdhs aus 12  $\mu$ g Gesamt-protein kam der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper zur Anwendung.

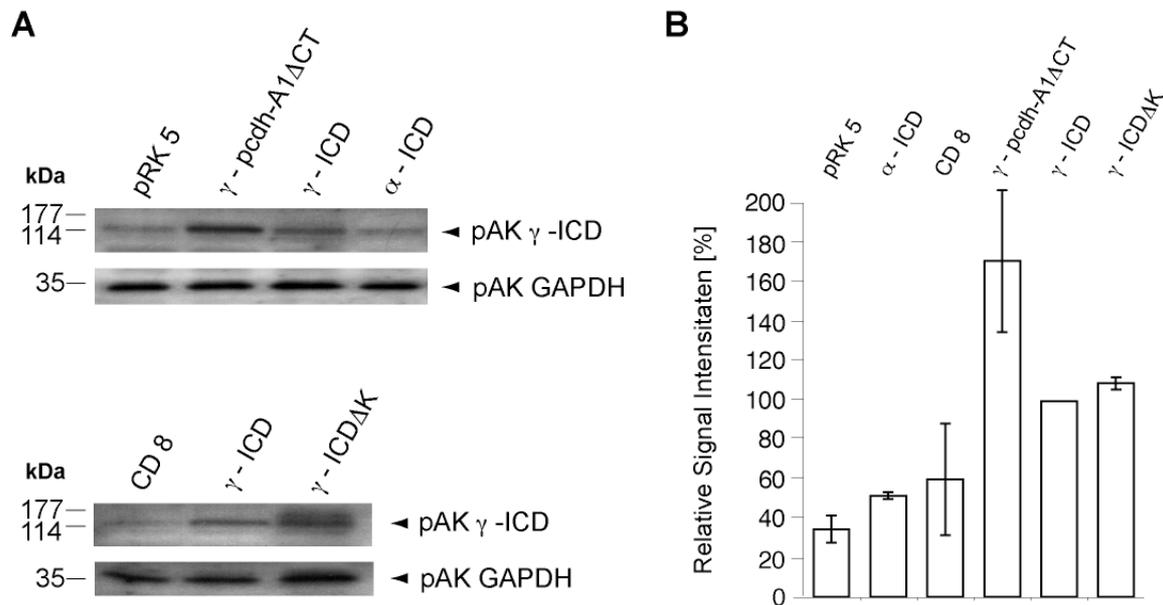
**B:** Die prozentual relativ zum Wildtyp angegebenen Signalintensitäten wurden jeweils aus drei verschiedenen transfizierten Kulturen jedes Genotyps gemittelt und Schwankungen der Auftragsmenge mit dem GAPDH-Antikörper detektiert und angeglichen.

Aufgrund der genannten technischen Probleme, sollte die These, dass die  $\gamma$ -ICD als genregulatorische Komponente die endogene  $\gamma$ -pcdh-Expression steigert in einem alternativen Zellkultursystem überprüft werden. Dieses sollte mit hohen Effizienzen transfizierbar sein und möglichst geringe Mengen an endogenem  $\gamma$ -pcdh produzieren, da in stark exprimierenden Zellen (wie z.B. in COS-1 Kulturen; Versuchsreihe zum Vergleich der Expressionsmengen verschiedener Zelltypen nicht aufgeführt) die molekularen Mechanismen, welche zu einer Steigerung der endogenen  $\gamma$ -pcdh-Expression führen, vermutlich bereits aktiviert sind. Diesen Anforderungen entsprechend, wurden HEK-293 Zellen entweder mit der  $^{Myc}\gamma$ -ICD oder mit einem als Kontrolle dienenden Konstrukt transfiziert.

Erwartungsgemäß wiesen die Lysate der  $^{Myc}\gamma$ -ICD exprimierenden Kulturen ca. doppelt so hohe Mengen an intrinsischem  $\gamma$ -pcdh auf, als die meisten, mit den entsprechenden Kontrollen transfizierten Kulturen (siehe Abbildung 2.2.3.A.). Weiterhin konnte auch eine Deletion des lysinreichen C-terminalen Bereichs den regulatorischen Effekt der  $\gamma$ -ICD nicht verhindern. Zwar sollte die vorgenommene Verkürzung der NLS den Kernimport des  $^{Myc}\gamma$ -ICDΔK Konstrukts vermindern und damit seine Funktion unterbinden, doch vermutlich aufgrund der passiven Diffusion des nur 15 kDa kleinen Proteins und vor allem der unphysiologisch hohen Expressionsmenge, sind immer noch große Mengen an  $^{Myc}\gamma$ -ICDΔK im Nukleus aktiv. Daraus folgt auch, dass die zur Genregulation benötigten Strukturen durch die vorgenommene Deletion unbeeinflusst bleiben.

überraschenderweise wiesen aber auch die  $^{EYFP}\gamma$ -pcdh A1Δ CD exprimierenden Kulturen hohe Mengen endogenen  $\gamma$ -pcdhs auf, welche die Signalstärken der  $^{Myc}\gamma$ -ICD exprimierenden Zellen sogar noch überstiegen. Da das entsprechende Konstrukt die extrazelluläre und transmembrane Region der  $\gamma$ -pcdh A1 Sequenz umfasst, aber über keinerlei zytoplasmatische Anteile verfügt, sind Beteiligungen an intrazellulären Signalwegen und daraus resultierende genregulatorische Funktionen eigentlich nicht vorstellbar. Wie in 2.4.A. ausgeführt, formiert

das <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 $\Delta$ CD Konstrukt mit unprozessiertem  $\gamma$ -pcdh aber Heterodimere [20]. Denkbar wäre also eine erhöhte Stabilität unprozessierten  $\gamma$ -pcdhs im entsprechenden Heterodimeren-Komplex. Eine Verminderung des Abbaus und nicht eine Erhöhung der Expressionsmenge führt in diesem Fall zu der beobachteten Signalstärke.



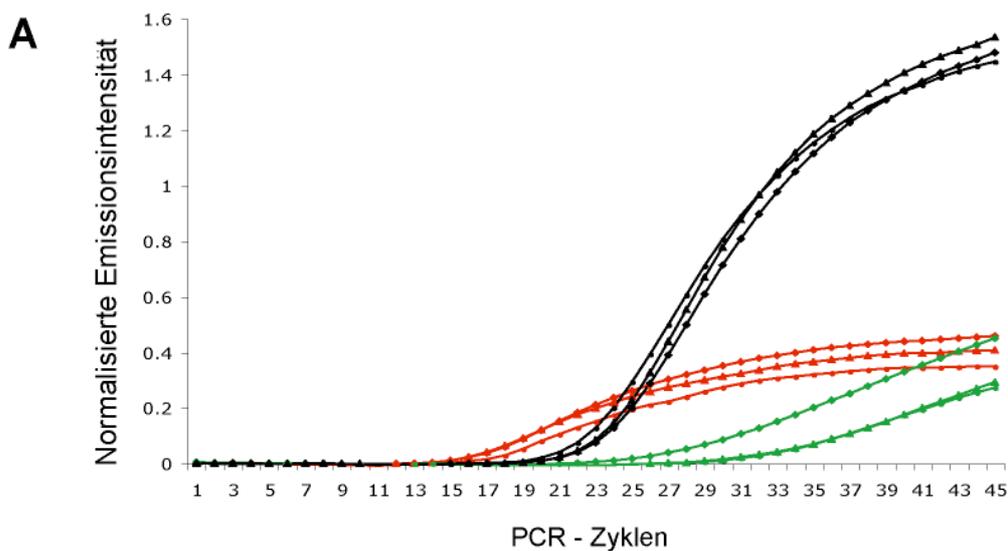
**Abbildung 2.2.3.A.:** „Western blot“-Analysen der aus transient transfizierten HEK-293 Kulturen gewonnenen Proteinlysate. Die Transfektionen erfolgten mit leerem Vektor (pRK5), dem <sup>Myc</sup> $\alpha$ -pcdh ICD Vektor, <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD Vektor, *pcDNA3-CD8* Vektor, <sup>Myc</sup> $\gamma$ -pcdh ICDΔK Vektor oder dem <sup>Myc</sup> $\gamma$ -pcdh ICD Vektor. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdh aus 80  $\mu$ g Gesamtprotein kam der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper zur Anwendung.

**B:** Die prozentual relativ zu den <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD exprimierenden Kulturen angegebenen Signalintensitäten wurden jeweils aus 4 identisch transfizierten Kulturen gemittelt und Schwankungen der Auftragsmenge mit dem GAPDH-Antikörper detektiert und angeglichen; individuelle Standardabweichungen sind als Balken graphisch wiedergegeben.

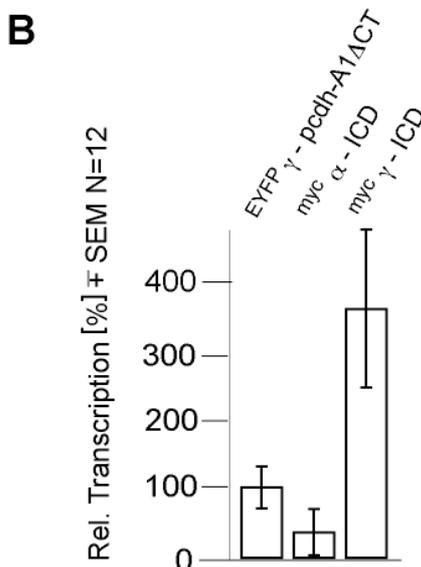
### 2.2.3. Quantifizierung intrinsischer $\gamma$ -Protocadherin Transkriptmengen in transient transfizierten Zellkulturen durch „Real-Time PCR“

Um die relativ ungenauen densitometrischen Quantifizierungen der „WB“-Analysen zu verifizieren, aber auch um eine genregulatorische Funktion des <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD Konstrukts auszuschließen, wurde aus analog zu 2.2.2. transfizierten HEK-293 Zellen mRNA isoliert und die daraus generierte cDNA-Menge durch „Real-Time PCR“ quantifiziert. Um alle 22 Isoformen des endogen exprimierten  $\gamma$ -pcdh-„Genklusters“ zu erfassen und da sich in mit <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD transfizierten Kulturen eine Detektion der  $\gamma$ -ICD ausschloss, wurden Primer und Hybridisierungsprobe gewählt, welche in der untranslatierten Region am 3' Ende des KR-Exons 3 paarten (siehe 4.2.2.5. und 4.1.7.). Die so bestimmte Menge an  $\gamma$ -pcdh-Transkript wurde anschließend mit Hilfe der ebenfalls über RT-PCR ermittelten Mengen an GAPDH-

und GFP-Transkript normalisiert. GFP (siehe 4.1.8.) wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz in den transient exprimierenden HEK-293 Zellkulturen genutzt. Tatsächlich finden sich in <sup>Myc</sup>γ-ICD exprimierenden, verglichen zu <sup>EYFP</sup>γ-pcdh A1 Δ CD oder <sup>Myc</sup>α-ICD exprimierenden, HEK-293 Zellen die 3-4-fachen Mengen an intrinsischer γ-pcdh-mRNS (siehe Abbildung 2.2.4.A.). Daraus folgt, dass <sup>Myc</sup>γ-ICD in HEK-293 Zellen die Transkriptmengen des eigenen Lokus steigert. Auch zeigt sich, dass die Zunahme der Mengen an unprozessiertem γ-pcdh-Protein in <sup>EYFP</sup>γ-pcdh A1 Δ CD exprimierenden Zellen auf deren erhöhte Stabilität im Heterodimeren-Komplex zurückzuführen ist. Da hier, im Gegensatz zu den Proteinmengen, die γ-pcdh-Transkriptmengen nicht gestiegen sind, führt tatsächlich die Verminderung der Abbaurates und nicht eine Erhöhung der Expressionsmenge zu der gestiegenen Signalstärke.



**Abbildung 2.2.4.A.:** Quantifizierung der in transient transfizierten HEK-293 Kulturen produzierten Transkripte durch „Real-Time PCR“. Die Transfektionen erfolgten mit dem <sup>Myc</sup>α-pcdh ICD Vektor (Dreieck), dem <sup>EYFP</sup>γ-pcdh A1 Δ CD Vektor (Viereck) oder dem <sup>Myc</sup>γ-pcdh ICD Vektor (Kreis). Graphisch dargestellt ist die durch eine passive Referenz normalisierte Emissionsintensität des Fluorophors gegen die Zahl der „PCR“-Zyklen. Jeder Transfektionsansatz wurde mit γ-pcdh-3'UTR (schwarz)-, exonischen GAPDH (rot)- und exonischen GFP (grün)-Primern und Sonden vermessen.



**B:** Die prozentual relativ zu den <sup>EYFP</sup>γ-pcdh A1 Δ CD exprimierenden Kulturen angegebenen normalisierten Signalintensitäten des Wendepunkts der γ-pcdh-3'UTR-Fluoreszenzkurven aus A wurden jeweils aus 12 identisch transfizierten Ansätzen gemittelt. Die mit dem Student T-Test (2T) ermittelten Signifikanzen sind relativ zu den mit der <sup>Myc</sup>γ-ICD erhaltenen Werten angegeben (<sup>Myc</sup>α-pcdh ICD:  $1,55 \times 10^{-5} \pm 13,3$  SEM; <sup>EYFP</sup>γ-pcdh A1 Δ CD:  $6,72 \times 10^{-6} \pm 9,9$  SEM; N=12 jeweils); Der SEM ist als Balken graphisch wiedergegeben.

#### 2.2.4. Die Transaktivierung der $\gamma$ -Protocadherin Promotoren durch die $^{Myc}\gamma$ -ICD

Unsere bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die  $^{Myc}\gamma$ -ICD in HEK-293 Zellen die Transkriptmengen des eigenen Lokus steigert. Unklar ist jedoch, ob dem wirklich der vermutete genregulatorische Effekt, oder möglicherweise eine Stabilisierung der bereits produzierten  $\gamma$ -pcdh-Transkripte zugrunde liegt. Um eine ursächliche Wirkung des  $^{Myc}\gamma$ -ICD auf die Regulation der Transkription der  $\gamma$ -pcdh zu demonstrieren, wurden verschiedene Promotorsequenzen 5' zu den Exons der Variablen Region in unterschiedlichen Längen amplifiziert und an das 5'-Ende der für Luziferase kodierenden Sequenzen kloniert. Mit Hilfe dieser Reporterkonstrukte konnte in HEK-293 Zellen dann die Wirkung diverser überexprimierter Proteine auf die Aktivität verschiedener Promotoren untersucht werden. Hierzu wurde die Luziferaseaktivität der Proteinlysate entsprechend transfizierter Zellen gemessen und mittels Transformationseffizienz normalisiert. Zur Ermittlung der Transformationseffizienz befand sich immer auch ein  $\beta$ -Galaktosidase-Reporterplasmid mit im Transfektionsansatz, durch den der Anteil der mit X-Gal blau gefärbten und somit als transfiziert identifizierten Zellen ermittelt werden konnte.

Wie aus Abbildung 2.2.5.A. ersichtlich, zeigen die mit  $^{Myc}\gamma$ -ICD kotransfizierten HEK-293 verglichen zu mit  $^{EYFP}\gamma$ -pcdh A1 oder  $^{Myc}\alpha$ -ICD transfizierten Zellkulturen eine ca. 10x erhöhte Reporteraktivität des  $\gamma$ -pcdh A2-Promotors. Im Vergleich zu  $^{EYFP}\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD transfizierten Zellen wurde sogar eine ca. 25-fach höhere Lumineszenz gemessen.

Die  $^{Myc}\alpha$ -ICD hat, wie in 2.2.2. und 2.2.3. gezeigt, keinen Einfluss auf die Expression der endogenen  $\gamma$ -pcdh. Da HEK-293 Kulturen außerdem nur geringe Mengen an endogenem  $\gamma$ -pcdh produzieren, ist es umso verwunderlicher, dass  $^{EYFP}\gamma$ -pcdh A1 transfizierte und  $^{Myc}\alpha$ -ICD transfizierte Zellkulturen in diesen Transaktivierungstests vergleichbare Signalintensitäten aufweisen. Die Promotoraktivierung in mit  $^{EYFP}\gamma$ -pcdh A1 transfizierten Zellkulturen ist zusätzlich von der proteolytischen (siehe 2.3.) Freisetzung der  $\gamma$ -ICD abhängig. Wie bereits unter 2.2.1. erwähnt, wird die  $\gamma$ -ICD, nach einer Prozessierung in das Zytoplasma abgegeben und in den Nukleus transloziert. Eine mögliche Erklärung wäre also, dass selbst die  $\gamma$ -ICD der endogenen  $\gamma$ -pcdh in HEK-293 Zellen nur zu einem gewissen Anteil und die des zusätzlichen, exogenen  $^{EYFP}\gamma$ -pcdh A1 in HEK-293 Zellen überhaupt nicht mehr freigesetzt werden und somit nicht mehr zu einer Signalerhöhung beitragen kann.

Eine Erklärung für die signifikant geringere Aktivität des A2-Promotors in  $^{EYFP}\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD transfizierten Zellkulturen liefert die unter 2.2.3. beobachtete Stabilisierung des unprozessierten, endogenen  $\gamma$ -pcdh-Proteins. Die  $\gamma$ -ICD von in Heterodimeren stabilisiertem, endogenem  $\gamma$ -pcdh-Protein scheint proteolytisch nicht freigesetzt zu werden und kann deshalb vermutlich auch nicht zu einer Erhöhung der Aktivität des A2-Promotors beitragen. Anders ausgedrückt scheint in  $^{EYFP}\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD transfizierten Zellen das geringe Aktivierungspotential endogenen  $\gamma$ -pcdh-Proteins vermindert zu werden. Diese, einer Deletion ähnlichen Situation wurde nun genutzt, um das reine Aktivierungspotential des  $^{Myc}\gamma$ -ICD, ohne einen Anteil endogenen  $\gamma$ -pcdh-Proteins auf weiteren  $\gamma$ -pcdh-Promotoren bestimmen zu können. Hierzu wurde für jedes getestete Reporterkonstrukt ein Quotient aus

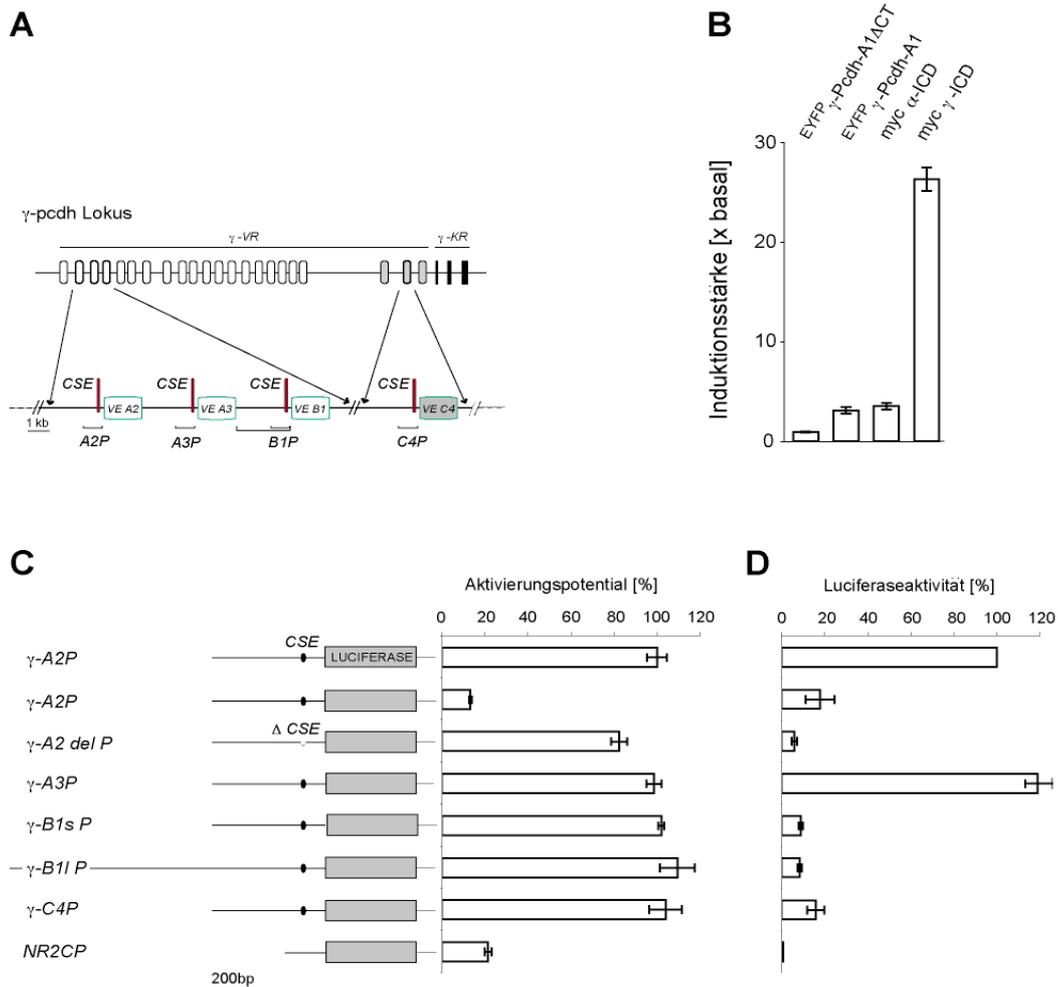


Abbildung 2.2.5.A.: Graphische Darstellung des  $\gamma$ -pcdh-Lokus und Position der getesteten Promotoren. B.: Histogramm der in Lysaten von transient transfizierten HEK-293 Kulturen gemessenen Luziferaseaktivitäten. Die Transfektionen erfolgten mit dem <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD Vektor, dem <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 Vektor, dem <sup>Myc</sup> $\alpha$ -pcdh ICD Vektor oder dem <sup>Myc</sup> $\gamma$ -pcdh ICD Vektor. Zur späteren Ermittlung der Transformationseffizienz durch Auszählen des Anteils der durch X-Gal gefärbten Zellen, wurde immer ein  $\beta$ -Galaktosidase Konstrukt mit den  $\gamma$ -pcdh Vektoren und dem  $\gamma$ -pcdhA2 Promotor/Luziferasereporter Konstrukt kotransfiziert. In der graphischen Darstellung wurden die gemessenen Luziferaseaktivitäten relativ zu den mit dem <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$  CD-Konstrukt erhaltenen Werten angegeben. Alle Werte wurden in Triplets gemessen; jedes Experiment wurde mindestens einmal wiederholt; Die individuelle Standardabweichung ist als Balken graphisch wiedergegeben.

C: Aktivierungspotential individuell verschiedener Promotoren, berechnet und dargestellt als Quotient aus den Luziferaseaktivitäten von <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD Vektor transfizierten und <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$  CD Vektor transfizierten HEK-293 Zellysaten (mit Ausnahme von 2.: hier wurde die Ratio aus <sup>Myc</sup> $\alpha$ -pcdh Vektor und <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$  CD Vektor transfizierten Zellen ermittelt). Das Aktivierungspotential des A2-Promotors wurde hierbei willkürlich mit 100% gleich gesetzt. Auch hier wurden alle Werte als Triplets gemessen und jedes Experiment mindestens einmal wiederholt; die individuelle Standardabweichung ist als Balken graphisch wiedergegeben. In der graphischen Repräsentation der Reporterkonstrukte ist die Größe der Promotoren durch die Länge der schwarzen Linie kodiert; 200 bp 5' zum ORF ist das KSE vermerkt.

D: Luziferaseaktivitäten der verschiedenen, mit dem <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD Vektor kotransfizierten und unter B aufgeführten Reporterkonstrukte. Die Aktivität des A2-Promotors wurde auch hier wieder mit 100% gleich gesetzt.

den mit dem  $^{Myc}\gamma$ -ICD und den mit dem  $^{EYFP}\gamma$ -pcdh A1 $\Delta$ CD Konstrukt erhaltenen Luziferaseaktivitäten errechnet. Wie für die in Abbildung 2.2.5.B. dargestellten, individuellen  $\gamma$ -pcdh-Promotoren gezeigt, sind die so ermittelten, verschiedenen Aktivierungspotentiale der  $^{Myc}\gamma$ -ICD nahezu identisch. Auch konnte mit Hilfe der NR2C- und CMV-Promotorkonstrukte, sowie mit Hilfe der  $^{Myc}\alpha$ -ICD demonstriert werden, dass die durch die  $^{Myc}\gamma$ -ICD vermittelte Induktion der Transkription spezifisch und selektiv für die  $\gamma$ -pcdh-Promotoren ist. Die gesteigerte Expression der  $^{Myc}\gamma$ -ICD resultiert also in der erhöhten transkriptionellen Aktivität der  $\gamma$ -pcdh-Promotoren.

Die Tatsache, dass sich die Aktivierungspotentiale der  $^{Myc}\gamma$ -ICD bei verschiedenen Promotoren so sehr gleichen, ist vor allem auch deswegen bemerkenswert, da sich deren Reporteraktivitäten in HEK-293 Zellen bis zu 20-fach von einander unterscheiden (siehe Abbildung 2.2.5.C). Die transkriptionelle Aktivierung durch die  $^{Myc}\gamma$ -ICD ist in HEK-293 Kulturen somit auch unabhängig von der jeweiligen Expressionsstärke des individuellen  $\gamma$ -pcdh-Promotors.

Die mechanistischen Hintergründe, welche für die Variabilität der Expressionsstärken der verschiedenen  $\gamma$ -pcdh-Promotoren verantwortlich sind, sind bislang leider nicht bekannt. Konstrukte, die unterschiedliche Längen der  $\gamma$ -pcdh B1-Promotorsequenzen beinhalten, zeigen weder in ihren Expressionstärken, noch in der Induzierbarkeit der Transkription durch  $^{Myc}\gamma$ -ICD nennenswerte Unterschiede. Hieraus lässt sich nur schließen, dass alle zur Regulation der  $\gamma$ -pcdh-Expression erforderlichen Elemente in den 5' zum Translationsstart lokalisierten, 1000 bp umfassenden, intronischen Sequenzen vorhanden sein müssen. Einen besseren Einblick in die Regulation individueller  $\gamma$ -pcdh-Promotoren verschafft hingegen das bereits (in [42]) beschriebene 200 bp 5' zum Transkriptionsstart liegende, konservierte Sequenzelement (KSE; siehe 1.2.). Früheren Beobachtungen entsprechend senkt eine Deletion des KSE die Transkriptionsaktivität des A2-Promotors auf 5% seines ursprünglichen Wertes (siehe Abbildung 2.2.5.C). Da das Aktivierungspotential der  $^{Myc}\gamma$ -ICD auf dem KSE-deletierten  $\gamma$ -pcdh-Promotor jedoch nach wie vor bei ca. 80% liegt, ist nicht davon auszugehen, dass dieser Sequenzabschnitt in die durch die  $^{Myc}\gamma$ -ICD vermittelte Genregulation involviert ist.

## 2.3. Die Abspaltung der $\gamma$ -ICD aufgrund Regulierter Intramembran Proteolyse (RIP)

### 2.3.1. Die proteolytische Prozessierung endogenen $\gamma$ -Protocadherin Proteins in murinem Gehirngewebe

Aus den Antikörperfärbungen transient exprimierender COS-1 Zellen (siehe 2.2.1.) wurde aufgrund der differentiellen Lokalisation der N-terminalen und C-terminalen  $\gamma$ -pcdh-Anteile geschlossen, dass, nach einer proteolytischen Prozessierung, die  $\gamma$ -ICD in das Zytoplasma abgegeben und von dort in den Nukleus importiert wird. Da die zellulären  $\gamma$ -pcdh-Spaltprodukte mit dem pAK  $\gamma$ -ICD gut auf „WBs“ detektiert werden konnten, wurde nun versucht aus den in Abbildung 2.1.4.A. dargestellten Signalen der Lysate murinen Gehirngewebes verschiedene Genotypen Rückschlüsse auf die Art und Erzeugung genregulatorisch aktiver  $\gamma$ -pcdh-Fragmente zu ziehen.

Da in homozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>AC1/AC1</sup>-Tieren keine ICD enthaltenden  $\gamma$ -pcdhs mehr exprimiert werden, konnten aus deren geblotteten Proteinlysaten die (mit einem Pfeil gekennzeichneten) unspezifischen Signale des verwendeten Antikörpers identifiziert werden. Es handelt sich dabei um Proteinfragmente mit Molekulargewichten von  $\sim 80$ ,  $\sim 35$  und  $\sim 22$  kDa.

Aus dem Vergleich mit den Proteolysemustern der Wildtyp-Lysate wurde als nächstes auf die spezifischen Abbauprodukte der  $\gamma$ -pcdhs geschlossen. Zu Ihnen zählen die Proteinfragmente mit Molekulargewichten von  $\sim 55$ ,  $\sim 40$ ,  $\sim 30$ ,  $\sim 26$  und  $\sim 20$  kDa.

Ausgehend von der Vermutung, dass das C-terminale Ende unversehrt bleibt, d.h. die Fragmente nur durch den Schnitt einer einzigen Protease erzeugt werden und bei einer durchschnittlichen Länge der 22  $\gamma$ -pcdh-Isoformen von ca. 930 Aminosäuren (ab Signalpeptid), wurde über EDV-unterstützte Massenvorhersagen der  $\gamma$ -pcdh-Sequenzen (DNA-Strider) für das 20 kDa-Fragment eine Länge von ca. 190 Aminosäuren ermittelt. Daraus folgt, dass das N-terminale Ende des untersuchten Fragments etwa bei Aminosäure 740 der  $\gamma$ -pcdh-Sequenzen liegen muss. Diese Position sollte nach errechneten Strukturvorhersagen intrazellulär, nahe an der Plasmamembran lokalisiert sein.

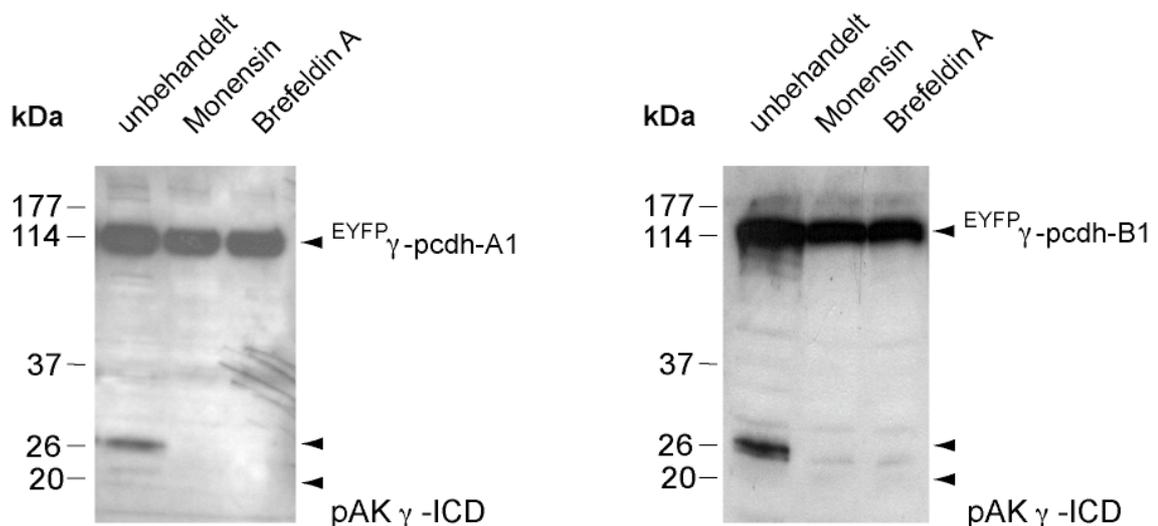
Aus einer analog angestellten Kalkulation folgt eine dem N-terminalen Ende des 26 kDa-Fragments entsprechende Position bei Aminosäure 680 der  $\gamma$ -pcdh-Sequenzen. Dieses Fragment könnte demnach durch den Schnitt einer extrazellulär, ebenfalls nahe der Plasmamembran tätigen Protease erzeugt werden. Das N-terminale Ende des 30 kDa-Fragments sollte sich entsprechend ca. bei Aminosäure 640, also ebenfalls im extrazellulären Raum befinden.

Das Auftreten von Proteolysesritten, bei welchen die extrazelluläre Domäne der  $\gamma$ -pcdh nahe der Plasmamembran entfernt und ein weiteres Fragment durch einen, vielleicht folgenden, Schnitt an der Transmembranregion erzeugt und in das Zytosol abgegeben wird, erinnert an einen als Regulierte Intramembran Proteolyse (RIP) [52] bezeichneten Mechanismus (siehe 1). Da eine entsprechende Prozessierung auch für die sequenzverwandten N- und E-Cadherine [18] beschrieben wurde, ist die Entstehung eines

genregulatorisch aktiven  $\gamma$ -pcdh-Spaltprodukts durch diesen Mechanismus sehr wahrscheinlich.

### 2.3.2. Pharmakologische Untersuchungen in $EYFP$ - $\gamma$ -pcdh A1 exprimierenden COS-1 Kulturen

Die Voraussetzung für die Prozessierung der  $\gamma$ -pcdh durch extrazelluläre Proteasen als initialer Schritt der RIP ist deren effektiver Transport an die Zelloberfläche. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die untersuchten Fragmente in Folge unspezifischen Abbaus fehlgefalteter Proteine im Golgi-Apparat erzeugt werden, wurden transient  $EYFP$ - $\gamma$ -pcdh A1 oder  $GFP$ - $\gamma$ -pcdh B1 exprimierende COS-1 Kulturen pharmakologischen Behandlungen unterworfen. Brefeldin A (0,3 mM) löste dabei über einen Zeitraum von 25 h den Golgi-Apparat auf und unterband den Transport jeglichen Proteins an die Plasmamembran. Monensin (83  $\mu$ M) verhinderte in analog transfizierten COS-1 Kulturen ebenfalls den Transport jeglichen Proteins vom Golgi-Apparat an die Zelloberfläche.

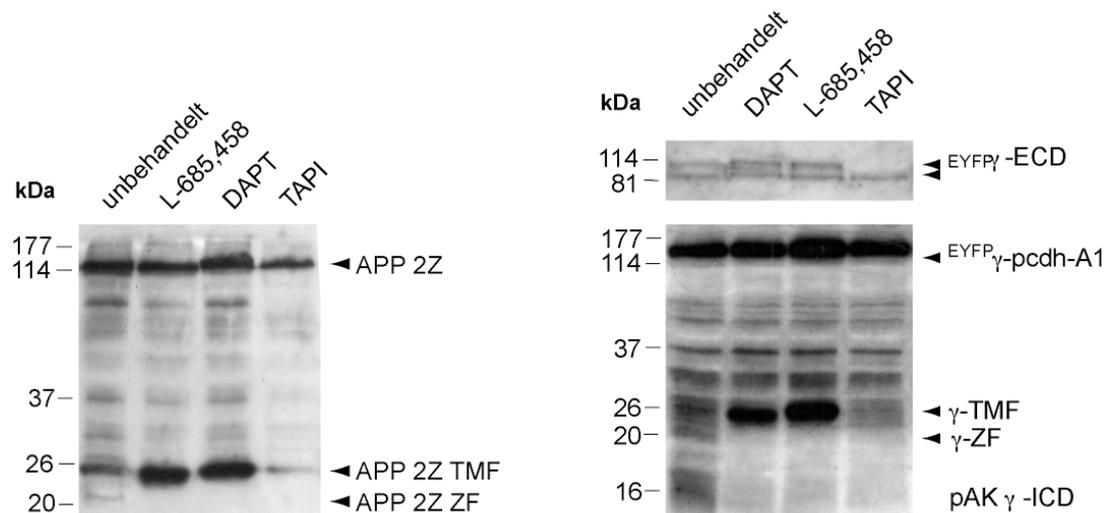


**Abbildung 2.3.1.:** „Western blot“-Analysen von Proteinlysate, gewonnen aus transient transfizierten und pharmakologisch behandelten COS-1 Kulturen. Die Transfektionen erfolgten mit dem  $EYFP$ - $\gamma$ -pcdh A1 oder dem  $GFP$ - $\gamma$ -pcdh B1 Vektor. Zur Verifizierung Plasmamembranspezifischer Prozessierungen wurden die Kulturen für 25 h entweder mit Monensin (83  $\mu$ M) oder Brefeldin A (0,3 mM) behandelt. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdh aus 0,1 mg Gesamtprotein kam der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper zur Anwendung.

Wie aus Abbildung 2.3.1. ersichtlich, exprimieren sowohl pharmakologisch behandelte, wie unbehandelte COS-1 Kulturen  $EYFP$ - $\gamma$ -pcdh A1 oder  $GFP$ - $\gamma$ -pcdh B1 in untereinander vergleichbaren Mengen. In Analogie zu den in den Proteinlysaten der Mäusehirne beobachteten Signalen, lassen sich in den unbehandelten Zellen mit dem pAK  $\gamma$ -ICD ebenfalls Proteinfragmente mit Molekulargewichten von 26 und 20 kDa detektieren. Pharmakologisch behandelte Kulturen zeigen keine vergleichbaren Banden. Dies spricht für eine spezifische

Prozessierung der  $\gamma$ -pcdhs an der Plasmamembran und gegen eine Produktion der 26 und 20 kDa-Fragmente aufgrund unspezifischer Degradation.

Eine zentrale Rolle in der RIP von Typ I Transmembranproteinen nimmt der im hydrophoben Milieu der Plasmamembran operierende  $\gamma$ -Sekretasekomplex ein. Seine bereits extrazellulär verstümmelten Substrate werden in der Plasmamembran weiter prozessiert, so dass ein kurzes Membranfragment und ein lösliches zytoplasmatisches Fragment entstehen. Wird nun die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase gehemmt, akkumulieren die extrazellulär verstümmelten Transmembranproteine an der Plasmamembran, während die Erzeugung weiterer löslicher zytoplasmatischer Fragmente unterbunden wird. Falls die  $\gamma$ -pcdhs ebenfalls durch RIP prozessiert werden, sollte dementsprechend in den Proteinlysaten <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 exprimierender und mit  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren behandelter COS-1 Kulturen eine äquivalente Veränderung des mit dem pAK  $\gamma$ -ICD detektierten Signalmusters zu erkennen sein.



**Abbildung 2.3.2.:** „Western blot“-Analysen von Proteinlysaten und Kulturüberständen, gewonnen aus transient transfizierten und pharmakologisch behandelten COS-1 Kulturen. Die Transfektionen erfolgten entweder mit dem <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 oder dem APP2Z Vektor. Zur Identifikation RIP- assoziierter Proteasen wurden die Kulturen entweder mit L-685.458 (7  $\mu$ M), DAPT (5  $\mu$ M) oder TAPI (40  $\mu$ M) behandelt. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdhs aus 0,1 mg Gesamtprotein kam der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper zur Anwendung; APP2Z konnte direkt mit einem gegen Kaninchen-IgG gerichteten, Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörper visualisiert werden. Die EYFP-markierte  $\gamma$ -pcdh-Ektodomäne wurde in jeweils identischen Mengen Kulturüberstand mit GFP-spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Wie aus Abbildung 2.3.2. ersichtlich, führt eine 12 h Behandlung von, zur Kontrolle mit APP2Z transfizierter COS-1 Kulturen mit 7  $\mu$ M L-685.458 oder 5  $\mu$ M DAPT (siehe 4.2.1.3.), im Vergleich zu analog transfizierten, aber unbehandelten Zellen, zu einer deutlichen Anreicherung des extrazellulär verstümmelten APP2Z-Membranfragments bei einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa [48]. Da außerdem das bei ca. 21 kDa auftretende, zytoplasmatische Spaltprodukt auf den „WBs“ pharmakologisch behandelten Kulturen kaum

mehr nachzuweisen ist, kann von der spezifischen Wirksamkeit dieser  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren in unserem Zellkultursystem ausgegangen werden.

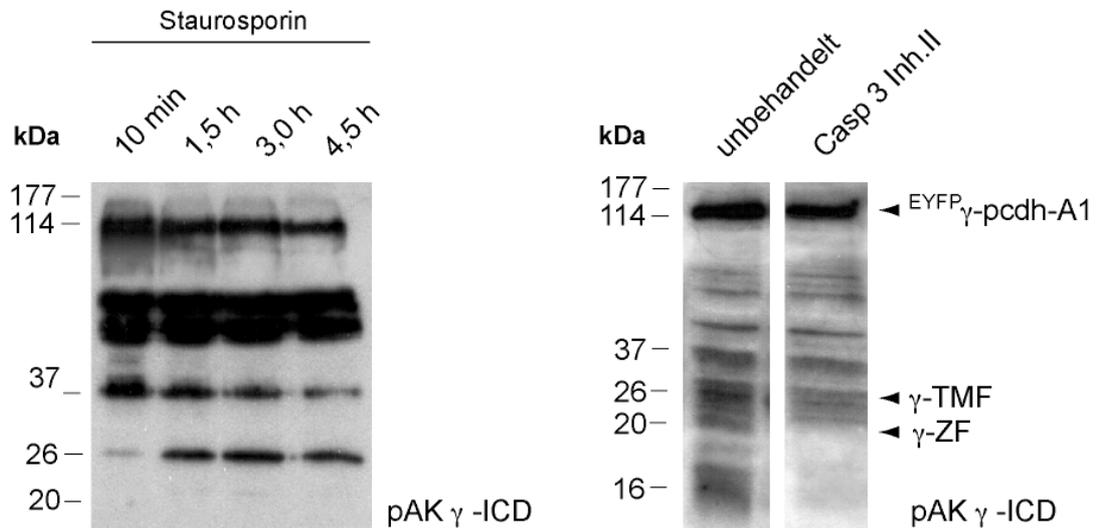
In gleicher Weise ist auch in den Proteinlysaten <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 exprimierender und mit L-685.458 oder DAPT behandelter COS-1 Kulturen mit dem pAK  $\gamma$ -ICD eine starke Zunahme des bei 26 kDa auftretenden Signals zu beobachten. Dieses Ergebnis stützt die unter 2.3.1. theoretisch angestellten Überlegungen, dass es sich bei diesem  $\gamma$ -pcdh-Spaltprodukt um ein extrazellulär verstümmeltes Transmembranfragment handeln muss. Verglichen mit unbehandelten COS-1 Zellen, ist in den entsprechend pharmakologisch behandelten Kulturen außerdem eine signifikante Abnahme des 20 kDa-Signals zu beobachten. Dies wiederum weist das entsprechende Signal als Produkt des  $\gamma$ -Sekretasekomplex und damit als das gesuchte, zytoplasmatische Fragment aus. Die Wirkung beider Substanzen auf die Mengen der beiden untersuchten Signale zeigt also, dass im Rahmen der RIP ein  $\gamma$ -pcdh-Transmembranfragment durch die spezifische Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase zu einem kleineren zytoplasmatischen Fragment prozessiert wird.

Wie kommt es zu einer Abspaltung der Ektodomäne und damit zu einer Initiation der RIP von  $\gamma$ -pcdh? Da für eine ständig wachsende Zahl von durch RIP prozessierter Substrate eine ganze Reihe distinkter, extrazellulärer Proteasen identifiziert wurden [4], gestaltete sich die Identifikation von  $\gamma$ -pcdh-spezifischen Matrixproteasen zunächst als wesentlich komplexer. Erschwerend kam dabei hinzu, dass, wie unter 2.3.1. erwähnt, neben dem 26 kDa Transmembranfragment mit dem pAK  $\gamma$ -ICD auch noch Proteinfragmente mit Molekulargewichten von  $\sim 55$ ,  $\sim 40$  und  $\sim 30$ , kDa detektierbar sind, welche höchstwahrscheinlich ebenfalls durch die Aktivität extrazellulärer Proteasen generiert werden. Da deren Signalstärken jedoch von den verwendeten  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren weitgehend unbeeinflusst bleiben, scheint ihre Beteiligung an der RIP in dem von uns verwendeten Zellkultursystem nur gering zu sein (weswegen sie auch nicht näher untersucht wurden).

Wie aus Abbildung 2.3.2. ersichtlich, zeigen sowohl die Proteinlysate von APP2Z-, wie von <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 exprimierenden COS-1 Kulturen nach 8-10 h Inkubation mit 40  $\mu$ M TAPI einen signifikanten Verlust der Signalstärken der 26 und 20 kDa-Fragmente. Bei TAPI handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor von extrazellulären Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) [26], welcher bei der Prozessierung von APP die Aktivität der so genannten  $\alpha$ -Sekretase unterbindet [17] (da das Spektrum von durch TAPI gehemmter MMP's jedoch breit ist, muss bei der Prozessierung der  $\gamma$ -pcdh's die  $\alpha$ -Sekretase nicht unbedingt involviert sein). Die Hemmung von MMP's scheint demnach die Abspaltung der  $\gamma$ -pcdh-Ectodomäne und somit auch die Menge erzeugten Membranfragments zu verringern. Damit steht letztendlich aber weniger Substrat für den  $\gamma$ -Sekretasekomplex zur Verfügung, was zusätzlich zu einer signifikanten Abnahme des zytoplasmatischen Fragments in den untersuchten Lysaten führen muss.

Unterstützt wird dieser Befund durch Proteinanalysen von Überständen pharmakologisch behandelter COS-1 Kulturen (siehe Abbildung 2.3.2.). Sowohl in den Überständen unbehandelter als auch mit  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren behandelter Kulturen, lassen sich mit GFP-Antikörpern die eng beieinander liegenden und in ihrer Intensität vergleichbaren Signale der

<sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1-Ektodomäne bei Molekulargewichten von ca. 100 und 105 kDa detektieren. Im Gegensatz dazu zeigen die Überstände der mit TAPI behandelten Zellkulturen lediglich das kleinere der beiden Spaltprodukte. Daraus folgt, dass das bei 105 kDa migrierende Signal auf eine Prozessierung der  $\gamma$ -pcdhs durch Matrixproteasen zurückzuführen ist, deren Zielsequenz näher als die einer bislang nicht charakterisierten weiteren Matrix-Protease an der Plasmamembran liegen und somit ein größeres N-terminales Spaltprodukt erzeugen muss.



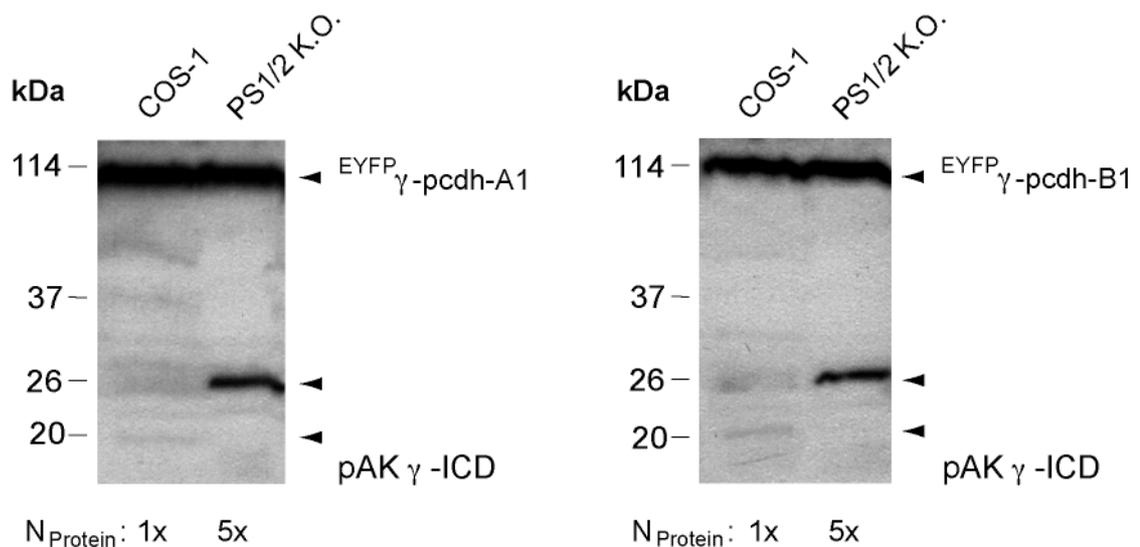
**Abbildung 2.3.3.:** „Western blot“-Analysen von Proteinlysaten, gewonnen aus transient transfizierten und pharmakologisch behandelten COS-1 Kulturen. Die Transfektionen erfolgten mit dem <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 Vector, die pharmakologischen Behandlungen entweder mit Caspase-3 Inhibitor II (80  $\mu$ M) (B) oder Staurosporin (0,5  $\mu$ M) (A). Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdhs aus 0,1 mg Gesamtprotein kam der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper zur Anwendung.

Bisherige Untersuchungen sprechen dafür, dass die  $\gamma$ -pcdhs durch RIP prozessiert werden, wobei ein genregulatorisch aktives Fragment entsteht. Der exzessive Verlust von Interneuronen durch Apoptose im späten Stadium der Embryogenese von  $\gamma$ -pcdh defizienten Mäusen [46] (siehe 1.4.) wirft die Frage auf, ob eine mögliche physiologische Bedeutung für diesen Mechanismus eventuell in einer anti-apoptotischen Wirkung zu finden ist. In weiterführenden Untersuchungen wurde deshalb in <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 exprimierenden COS-1 Kulturen mit 0,5  $\mu$ M Staurosporin Apoptose induziert. Die nach verschiedenen Zeitintervallen geernteten Kulturen zeigen dabei bereits nach 1,5 h eine starke Anhäufung des 26 kDa-Fragments (siehe Abbildung 2.3.3.A), im Gegensatz dazu aber auch eine Reduktion der Signalintensität des 30 kDa-Fragments über einen Zeitverlauf von 4,5 h. Gegen eine Beteiligung der RIP von  $\gamma$ -pcdh in der Apoptose, spricht aber die Tatsache, dass trotz der vermehrten Abspaltung der Ektodomäne, über den gesamten Zeitverlauf kein durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex generiertes zytoplasmatisches Fragment detektiert werden konnte. Dies deckt sich mit Beobachtungen [6], wonach der  $\gamma$ -Sekretasekomplex während der Apoptose durch eine Caspase-3 vermittelte proteolytische Prozessierung inaktiviert wird. Eine genregulatorische Funktion des zytoplasmatischen Fragments scheint in der Apoptose also keine Rolle zu spielen.

Im Gegensatz dazu spricht die starke Anhäufung des 26 kDa-Fragments für eine vermehrte Aktivierung der MMP's in der Apoptose, vermutlich um apoptotische Zellen aus ihrem Zellverband zu lösen. Auch dies deckt sich mit Beobachtungen, die bereits bei der Prozessierung von E-Cadherin gemacht wurden [38]. Die dort beschriebenen Caspase-3 defizienten Zellen weisen *vice versa* außerdem stark reduzierte MMP-Aktivitäten auf. Dies wird dort als Befund gewertet, dass MMP's durch die Caspase-3 aktiviert werden. Analog dazu ist in, mit 80  $\mu$ M Caspase-3 Inhibitor II behandelten, <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 exprimierenden Zellen (siehe Abbildung x.x.B), eine starke Reduktion des 26 kDa-Fragments zu beobachten. Die Caspase-3 zeigt auch hier ihren Einfluss auf die MMP-vermittelte Prozessierung der  $\gamma$ -pcdh. Die damit einher gehende Reduktion des 20 kDa-Fragments, unterstreicht damit erneut die Rolle der MMP's bei der Initiation der RIP von  $\gamma$ -pcdh.

### 2.3.3. Proteinanalysen in <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 exprimierenden Presenilin 1&2 defizienten Zelllinien

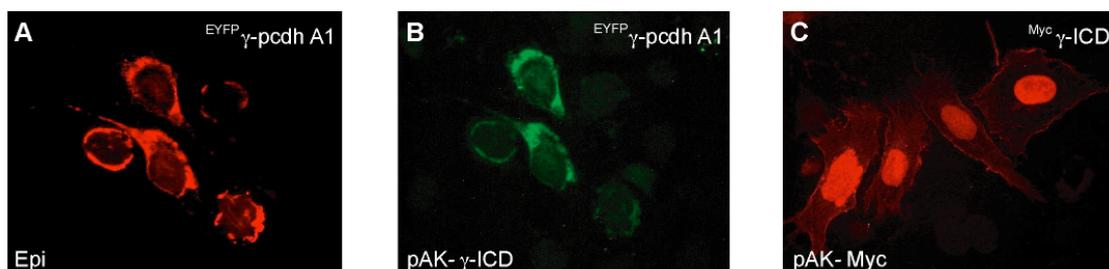
Um die durch pharmakologische Interventionen gewonnen Belege für die RIP von  $\gamma$ -pcdh zu unterstützen, wurde als nächstes untersucht, ob eine genetische Inaktivierung des  $\gamma$ -Sekretasekomplex ähnliche Effekte aufweist, wie sie mit den Inhibitoren DAPT und L-685.458 erzielt wurden. Darum wurde ein murines Zellkultursystem gewählt, in dem die Expression der katalytisch aktiven Komponenten des  $\gamma$ -Sekretasekomplex, die Preseniline 1 & 2 über eine Deletion des Exon 5 verhindert wurde (siehe 4.1.5.) [8][30].



**Abbildung 2.3.4.:** „Western blot“-Analysen von Proteinlysaten, gewonnen aus transient transfizierten COS-1 und PS1/2 defizienten Kulturen. Die Transfektionen erfolgten mit dem <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1- oder <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh B1 Vector. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdhs kam der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper zur Anwendung.

Wie aus Abbildung 2.3.4. ersichtlich, zeigten die Lysate der PS1/2 defizienten Fibroblasten auf, mit dem pAK  $\gamma$ -ICD entwickelten „WBs“ erst bei ca. 5-fach erhöhten Gesamtproteinmengen mit COS-1 Kulturen vergleichbare Expressionen der transfizierten <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1- oder <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh B2 Konstrukte. Wie erwartet war dann aber mit beiden Konstrukten im Vergleich zu analog transfizierten COS-1 Zellen, eine signifikant erhöhte Anhäufung des 26 kDa-Transmembran-Fragments und ein Verlust des zytosolischen 20 kDa-Fragments zu beobachten. Auch hier zeigt sich somit, dass sich die Intensitäten der verschiedenen untersuchten Spaltprodukte durch den Verlust der  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität verändern. Es bestätigt sich damit der Befund, dass im Rahmen der RIP ein  $\gamma$ -pcdh-Transmembranfragment durch die spezifische Interaktion mit der  $\gamma$ -Sekretase zu einem kleineren zytoplasmatischen Fragment prozessiert wird.

Mikroskopische Aufnahmen (Abbildung 2.3.5.) bestätigen ebenfalls die Expression, den korrekten Transport und die gelungene Insertion des <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 Konstrukts in die Plasmamembran von PS1/2 defizienten Fibroblasten. Die bei entsprechenden Wellenlängen angeregten Fusionsproteine zeigen, ebenso wie in COS-1 Zellen, eine hauptsächlich zytosolische und an distinkten Punkten konzentrierte Lokalisation der Fluoreszenz (A). Färbungen mit dem pAK  $\gamma$ -ICD ergaben jedoch ein von den COS-1 Zellen abweichendes Bild. Das detektierte Signal kolokalisiert hier weitestgehend mit der direkten Fluoreszenz, die Kerne bleiben ungefärbt. Durch die fehlende Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase in PS1/2 defizienten Fibroblasten wird daher offensichtlich kein zytosolisches  $\gamma$ -pcdh-Fragment mehr erzeugt, welches nach seiner Freisetzung in den Kern importiert werden kann. Intakte und extrazellulär verstümmelte  $\gamma$ -pcdhs lassen sich hingegen an der Plasmamembran darstellen. Neben der Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase bestätigt sich damit auch die Spezifität des in COS-1 (siehe Abbildung 2.2.1.) mit den  $\gamma$ -ICD- und Myc-Antikörpern beobachteten Kernsignals.

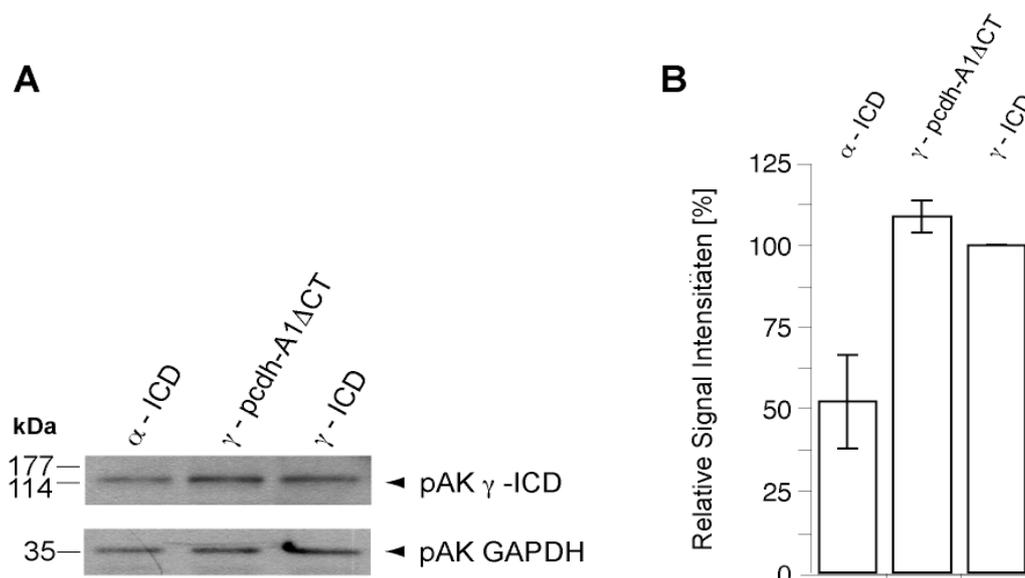


**Abbildung 2.3.5.:** Mikroskopische Aufnahmen von transient mit <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 (A,B) oder <sup>Myc</sup> $\gamma$ -pcdh ICD (C) transfizierten, permeabilisierten PS1/2 defizienten Fibroblasten. Die Anregung des N-terminal mit einem Fluorophor fusionierten Proteins erfolgte bei Wellenlängen von 514 nm, die Emission bei 545 nm. Der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper wurde mit einem bei 488 nm (B) und der gegen das Myc-Epitop (C) gerichtete Antikörper mit einem bei 595 nm anregbaren, konjugierten, Spezies spezifischen (sekundären) Antikörper visualisiert.

Um weiterhin auszuschließen, dass die Kerne der PS1/2 defizienten Fibroblasten aufgrund eines Importdefekts ungefärbt bleiben, wurden die Kulturen mit dem <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD- Konstrukt transfiziert und mit einem Myc-spezifischen Antikörper gefärbt. Wie aus Abbildung 2.3.5.C. ersichtlich, findet sich das entsprechende Signal hier beinahe ausschließlich im Nukleus.

Um außerdem zu zeigen, dass die durch die <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD vermittelte Steigerung der Expression endogenen  $\gamma$ -pcdhs unabhängig von der RIP der  $\gamma$ -pcdhs stattfinden kann, wurden in den Proteinlysaten von entweder <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD, <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD oder <sup>Myc</sup> $\alpha$ -ICD transfizierten PS1/2 defizienten Fibroblasten erneut die endogenen Mengen an  $\gamma$ -pcdh quantifiziert. Wie aus den „WBs“ der Abbildung 2.3.6. ersichtlich, ergibt sich hier ein ähnliches, wie unter 2.2.2. für HEK-293 Zellen beobachtetes Bild. Erwartungsgemäß weisen die Lysate der <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD exprimierenden Kulturen ca. doppelt so hohe Mengen an intrinsischem  $\gamma$ -pcdh, als die mit <sup>Myc</sup> $\alpha$ -ICD transfizierten Kulturen auf. Störende Einflüsse der endogen erzeugten zytosolischen Fragmente auf die beobachteten Signalstärken können diesmal allerdings ausgeschlossen werden. Auch bestätigt sich hier wieder die erhöhte Stabilität der  $\gamma$ -pcdhs im entsprechenden <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD-Heterodimeren-Komplex.

Daraus folgt, dass die PS1/2 defizienten Fibroblasten keine Kernimport- oder regulatorischen Defekte aufweisen. Die Prozessierung von <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 bleibt hier aufgrund der fehlenden  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität unvollständig. Die  $\gamma$ -pcdhs werden durch RIP prozessiert, die Steigerung der Expression endogenen  $\gamma$ -pcdhs durch die <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD kann jedoch unabhängig davon geschehen.



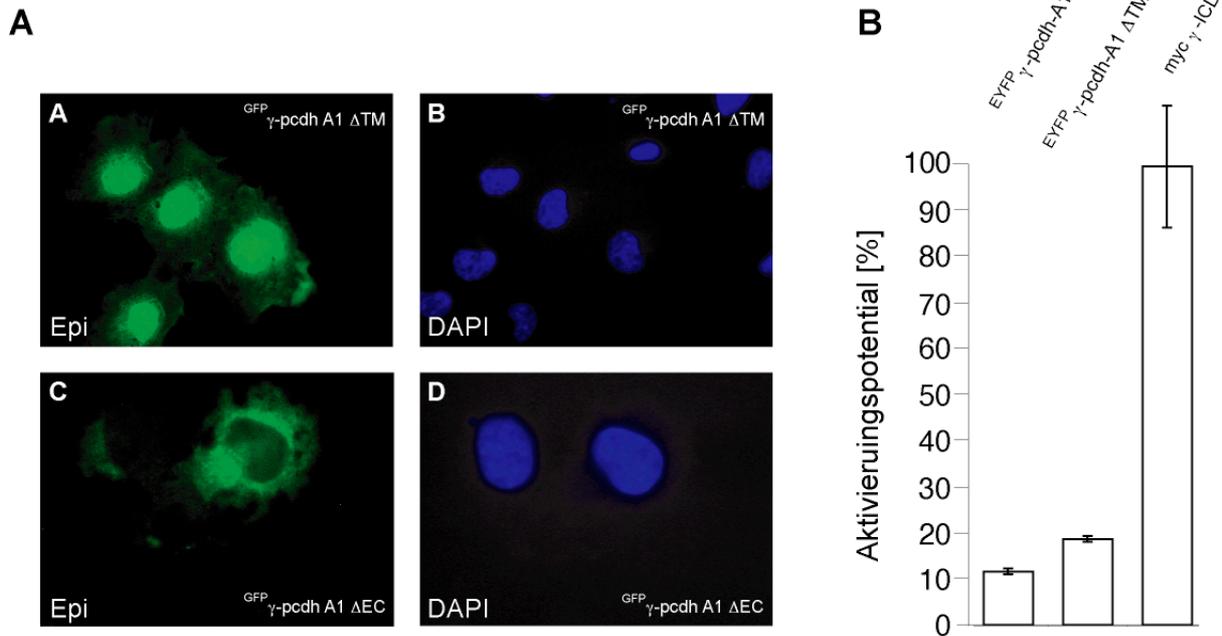
**Abbildung 2.3.6.A.:** „Western blot“-Analysen der aus transient transfizierten PS1/2 defizienten Fibroblasten gewonnenen Proteinlysate. Die Transfektionen erfolgten mit dem <sup>Myc</sup> $\alpha$ -pcdh ICD Vektor, <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh  $\Delta$ CD Vektor oder dem <sup>Myc</sup> $\gamma$ -pcdh ICD Vektor. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdhs aus 40  $\mu$ g Gesamtprotein wurde der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper verwendet. **B:** Die prozentual relativ zu den <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD exprimierenden Kulturen angegebenen Signalintensitäten wurden jeweils aus 4 identisch transfizierten Kulturen gemittelt und Schwankungen der Auftragsmenge mit dem GAPDH-Antikörper detektiert und angeglichen; individuelle Standardabweichungen sind als Balken graphisch wiedergegeben.

### 2.3.4. Die Funktionalität eines mutmaßlichen $\gamma$ -Sekretase-Produkts

Auch wenn das durch RIP erzeugte zytoplasmatische  $\gamma$ -pcdh-Fragment höchstwahrscheinlich die Sequenz der  $\gamma$ -ICD enthält, blieb die Darstellung einer genregulatorischen Funktion bisher nur auf die <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD beschränkt. Da bekannt ist, dass die  $\gamma$ -Sekretase ihre Substrate am C-terminalen Ende der Plasmamembran prozessieren kann [48], sollte mit Hilfe des <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM Konstrukts geklärt werden, ob ein möglichst langes, bis zur Membran reichendes, zytoplasmatisches  $\gamma$ -pcdh-Fragment direkt in den Kern importiert, oder ob die  $\gamma$ -ICD vorher eventuell durch die Aktivität einer bislang unbekannt Protease nochmals freigesetzt wird. Das Konstrukt kodiert die gesamte  $\gamma$ -pcdh A1 C-terminale Sequenz mit Beginn der unmittelbar nach der Transmembran-Domäne lokalisierten Aminosäure 719 (Beginn ab Signalpeptid) und wurde N-terminal mit cMyc-GFP fusioniert. Das mikroskopische Bild entsprechend transfizierter und mit DAPI behandelte COS-1 Zellen (siehe Abbildung 2.3.7.A.) zeigt nach einer Anregung bei 514 nm eine über die gesamte Zelle verteilte, starke Fluoreszenz des <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM Konstrukts. Bei einem Vergleich mit den durch DAPI gefärbten Kernen ist jedoch ersichtlich, dass die größte Signalstärke des <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 $\Delta$ TM Konstrukts im Nukleus erzielt wird. Die 89 zusätzlichen Aminosäuren der  $\gamma$ -pcdh A1-Sequenz und GFP verhindern offensichtlich nicht den Kernimport des zytoplasmatischen Fragments und müssen vor Eintritt in den Nukleus nicht weiter prozessiert werden.

Ein gegensätzliches Bild wurde hingegen mit dem als Kontrolle konzipierten <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ EC Konstrukt erzielt. Das Konstrukt kodiert ab AS 650 (Beginn ab Signalpeptid) bis Ende der  $\gamma$ -pcdh A1 Proteinsequenz, umfasst damit die zytoplasmatische-, transmembrane- und 39 Aminosäuren der extrazellulären Domäne und wurde N-terminal mit cMyc-GFP fusioniert. Erwartungsgemäß bleiben im mikroskopischen Bild der entsprechend transfizierten und bei 514 nm angeregten COS-1 Kulturen die Kerne ungefärbt. Die detektierbare, schwache Fluoreszenz liegt diffus über das Zytoplasma verteilt vor. Da die Ähnlichkeit dieses Konstrukts mit extrazellulär verstümmelten Transmembran-Fragmenten es wahrscheinlich zu einem Substrat des  $\gamma$ -Sekretasekomplex macht, wird der an GFP fusionierte, N-terminale Teil nach einer Spaltung in der Transmembran-Region vermutlich sezerniert und macht sich deshalb nur noch als diffus fluoreszierender Hintergrund bemerkbar. Die wenigen an der Plasmamembran und im sekretorischen Weg verbleibenden intakten <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ EC-Proteine zeigen ihren Mengen entsprechend nur noch geringe Fluoreszenzintensitäten.

Der Import des <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 $\Delta$ TM Konstrukts in den Zellkern lässt natürlich auch eine Steigerung der endogenen  $\gamma$ -pcdh-Expression erwarten, wie sie bereits für die <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD beschrieben wurde. Mit Hilfe des unter 2.2.4. beschriebenen Luziferase-Reporter-Systems wurde daher in HEK-293 Zellen die Wirkung des <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM Konstrukts auf die Aktivität des  $\gamma$ -pcdh A2-Vektors untersucht. Die normierten Luziferaseaktivitäten der Proteinlysate von, mit dem zu testenden Transaktivator transfizierten Zellen, wurden zur Ermittlung des Aktivierungspotentials wieder durch die aus, mit dem <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD Konstrukt transfizierten Zellen erhaltenen Aktivitäten dividiert.



**Abbildung 2.3.7.A.:** Mikroskopische Aufnahmen von transient mit  $\text{GFP}\gamma\text{-pcdh A1 } \Delta\text{TM}$  (A, B) oder  $\text{GFP}\gamma\text{-pcdh A1 } \Delta\text{EC}$  (C, D) transfizierten COS-1 Kulturen. Die Anregung der N-terminal mit einem Fluorophor fusionierten Proteine erfolgte bei Wellenlängen von 514 nm, die Emission bei 545 nm (A, C). DAPI lässt sich bei 358 nm anregen und emittiert bei 461 nm (B, D).

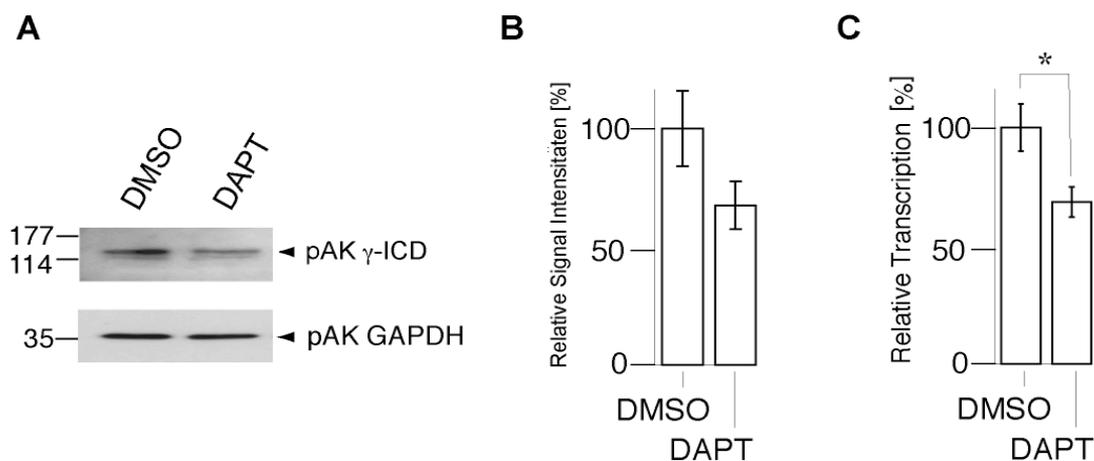
**B:** Histogramm der in Lysaten von transient transfizierten HEK-293 Kulturen gemessenen Aktivierungspotentiale des  $\gamma\text{-pcdh A2}$ -Promotors. Die Transfektionen erfolgten mit dem  $\text{GFP}\gamma\text{-pcdh A1 } \Delta\text{TM}$  Vektor, dem  $\text{EYFP}\gamma\text{-pcdh A1}$  Vektor oder dem  $\text{Myc}\gamma\text{-pcdh ICD}$  Vektor. Zur späteren Ermittlung der Transformationseffizienz durch Auszählen des Anteils der durch X-Gal gefärbten Zellen, befand sich immer ein  $\beta\text{-Galaktosidase}$  Konstrukt mit im Transfektionsansatz. Das Aktivierungspotential ist als Quotient der gemessenen Luziferaseaktivitäten von Test-Vektor transfizierten und  $\text{EYFP}\gamma\text{-pcdh A1 } \Delta\text{CD}$  Vektor transfizierten HEK-293 Zelllysaten definiert. Das Aktivierungspotential des  $\text{Myc}\gamma\text{-pcdh ICD}$  Vektors wurde hierbei willkürlich mit 100% gleich gesetzt. Alle Werte wurden in Triplets gemessen; die individuelle Standardabweichung ist als Balken graphisch wiedergegeben.

Wie aus Abbildung 2.3.7.B. ersichtlich, liegt das  $\text{GFP}\gamma\text{-pcdh A1 } \Delta\text{TM}$  Konstrukt mit ~ 20% des mit der  $\text{Myc}\gamma\text{-ICD}$  erzielten Aktivierungspotentials nur wenig über den mit dem  $\text{EYFP}\gamma\text{-pcdh A1}$  Konstrukt erzielten ~ 10%. Das ist verwunderlich, würde es doch bedeuten, dass, unter der Voraussetzung, dass beide Konstrukte in gleichen Mengen exprimiert werden, (10 von 20%, also) ca. 50% des  $\text{EYFP}\gamma\text{-pcdh A1}$  Konstrukts prozessiert und genregulatorisch aktiv werden müssten. Dies widerspricht den unter 2.2.4. beobachteten, vermutlich niedrigen Prozessierungsraten der HEK-293 Kulturen. Außerdem wäre dies ein Beleg dafür, dass die genregulatorische Potenz der  $\gamma\text{-ICD}$  durch den, 90 Aminosäuren umfassenden, N-terminalen Anhang ca. um den Faktor 5 reduziert wäre. Viel wahrscheinlicher scheint daher eine sterische Behinderung der im Kern stattfindenden Interaktion des  $\gamma\text{-pcdh A1 } \Delta\text{TM}$  Konstrukts durch das angehängte, globuläre GFP-Protein zu sein. Der dadurch vermutlich erschwerte Zugang zu den Bindedomänen von „Enhancern“, Repressoren, Promotorstellen oder Transkriptionsfaktoren würde selbstverständlich die Signalstärken des Reporterkonstrukts

reduzieren. Vorerst erlauben diese Befunde also nur den Schluss, dass  $\text{GFP}^{\gamma}\text{-pcdh A1 } \Delta\text{TM}$  nur bedingt als Modellprotein nützlich ist, die transkriptionelle Regulation des, von der  $\gamma$ -Sekretase erzeugten, zytoplasmatischen  $\gamma$ -pcdh-Fragments nachzuahmen.

### 2.3.5. Quantifizierung intrinsischer $\gamma$ -Protocadherin Mengen in pharmakologisch behandelten SH-SY5Y Kulturen

Auch wenn das über RIP erzeugte zytoplasmatische  $\gamma$ -pcdh-Fragment in den Nucleus importiert werden kann, ohne vorher weiter prozessiert werden zu müssen, bestehen immer noch Zweifel, ob dadurch die Expression endogenen  $\gamma$ -pcdh's wirklich gesteigert werden kann. Um zu beweisen, dass der mit der  $\text{Myc}^{\gamma}\text{-ICD}$  erzielte Effekt kein Artefakt eines physiologisch nicht vorkommenden Proteins ist, sondern den Effekt der kleinsten aktiven Einheit widerspiegelt, wurden  $\gamma$ -pcdh exprimierende SH-SY5Y Zellen für 12 h mit dem  $\gamma$ -Sekretaseinhibitors DAPT (10  $\mu\text{M}$ ) behandelt um die Prozessierung endogenen Proteins zu verhindern. Aus den hieraus gewonnenen Proteinlysaten wurden anschließend auf „WB's“ unter Verwendung des pAK  $\gamma$ -ICD die Mengen endogenen  $\gamma$ -pcdhs bestimmt.



**Abbildung 2.3.8.A.:** „Western blot“-Analysen der Proteinlysate pharmakologisch behandelte SH-SY5Y Kulturen. Die pharmakologischen Behandlungen erfolgten entweder für 12 h mit DAPT (10  $\mu\text{M}$ , in DMSO) oder DMSO. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdhs aus 30  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein kam der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper zur Anwendung. **B:** Die prozentual relativ zu den mit DMSO behandelten Zellen angegebenen Signalintensitäten wurden jeweils aus 4 identisch inkubierten Kulturen gemittelt und Schwankungen der Auftragsmenge mit dem GAPDH-Antikörper detektiert und angeglichen; individuelle Standardabweichungen sind als Balken graphisch wiedergegeben.

**C:** Quantifizierung der in pharmakologisch behandelten SH-SY5Y Kulturen produzierten Transkripte durch „Real-Time PCR“. Jede Kultur wurde mit  $\gamma$ -pcdh-3'UTR und exonischen GAPDH-Primern und Sonden vermessen. Die prozentual relativ zu den mit DMSO behandelten Kulturen angegebenen, normalisierten Signalintensitäten des Wendepunkts der  $\gamma$ -pcdh-3'UTR-Fluoreszenzkurven wurden jeweils aus 11 identisch transfizierten Ansätzen gemittelt. Der individuelle Standardfehler ist als Balken graphisch wiedergegeben; die Signifikanzen wurden mit dem Student T-Test (2T) ermittelt ( $1,18 \times 10^{-2} \pm 0,064$  SEM; N=11)

Wie nun aus Abbildung 2.3.8. ersichtlich, verursacht die Hemmung des  $\gamma$ -Sekretasekomplex in den mit DAPT behandelten Kulturen eine 33%ige Reduktion der Expression endogenen  $\gamma$ -pcdhs. Damit lässt sich zeigen, dass durch die beeinträchtigte Erzeugung des zytoplasmatischen  $\gamma$ -pcdh-Fragments auch die Expression endogenen  $\gamma$ -pcdhs beeinträchtigt ist. Der durch die <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD erzielte Effekt kann somit auch durch ein endogen hervorgebrachtes, funktionelles Homolog dargestellt werden.

Zur Stützung dieses Befunds wurde die RNS aus identisch behandelten SH-SY5Y Kulturen isoliert und die daraus generierte cDNS-Menge durch „Real-Time PCR“ quantifiziert. Die Bestimmung der enthaltenen Menge an  $\gamma$ -pcdh-Transkript erfolgte wieder über Primer und Hybridisierungssonde, welche in der untranslatierten Region am 3`Ende des Genlokus paarten. Normiert wurden diese Werte mit Hilfe der ebenfalls über RT-PCR ermittelten Menge an GAPDH-Transkript.

Die in Abbildung 2.3.8.C. aufgeführten Resultate von 11 mit DAPT behandelten und vermessenen Kulturen demonstrieren eindrucksvoll eine zu den Proteinanalysen nahezu identische, signifikante Reduktion der Transkriptmengen. Die Hemmung des  $\gamma$ -Sekretasekomplex resultiert auch hier in einer 33%igen Reduktion der Expression endogenen  $\gamma$ -pcdhs. Die in mit DAPT behandelten Kulturen erzielte Verminderung an endogenem, zytoplasmatischem  $\gamma$ -pcdh-Fragment wirkt sich somit eindeutig schwächend auf die Transkription endogenen  $\gamma$ -pcdhs aus. Daraus folgt, dass das zytoplasmatische  $\gamma$ -pcdh-Fragment genregulatorsich aktiv werden kann und dass sich die RIP und die Expressionsstärke des Genlokus der  $\gamma$ -pcdhs direkt miteinander korrelieren lassen.

## 2.4. Dimerisierung der $\gamma$ -Protocadherine [20]

Wie zu Beginn bereits erwähnt (siehe 1.), formieren sich die N- und E-Cadherine nach der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  zu Homodimeren, sind damit resistenter gegen tryptischen Verdau und stark adhärierend [25][41]. Die Dimerisierung der synaptisch lokalisierten N-Cadherine lässt sich sogar durch die Depolarisation mit 25 mM  $\text{K}^+$  induzieren, scheint also auch bedeutend für die synaptische Übertragung zu sein [41]. Beide Proteine sind strukturverwandt mit den  $\gamma$ -pcdhs und werden ebenfalls durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert. Für das bekannteste, durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessierte Protein, APP, wurde sogar eine gesteigerte Prozessierung der homodimeren Form beschrieben [34]. Bereits mehrfach wurde außerdem vorweggenommen, dass endogenes  $\gamma$ -pcdh in der mit <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 $\Delta$  CD heterodimeren Form weniger zugänglich für Prozessierungen durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex ist.

Die Formierung von Dimeren könnte offensichtlich eine Rolle bei der Regulation von Adhäsion, Ligandenbindung, Stabilität, Prozessierung und Signaltransduktion der  $\gamma$ -pcdhs spielen. Aus diesem Grund wurde diese mit Hilfe verschiedener, in COS-1 Kulturen exprimierter Konstrukte charakterisiert. Aus den Proteinlysaten dieser Kulturen wurde zunächst mit Hilfe eines an Protein A-Agarose gekoppelten, gegen das Flag-Epitop gerichteten, monoklonalen Antikörpers das  $\gamma$ -pcdh B1<sup>Flag</sup> Konstrukt isoliert und zur

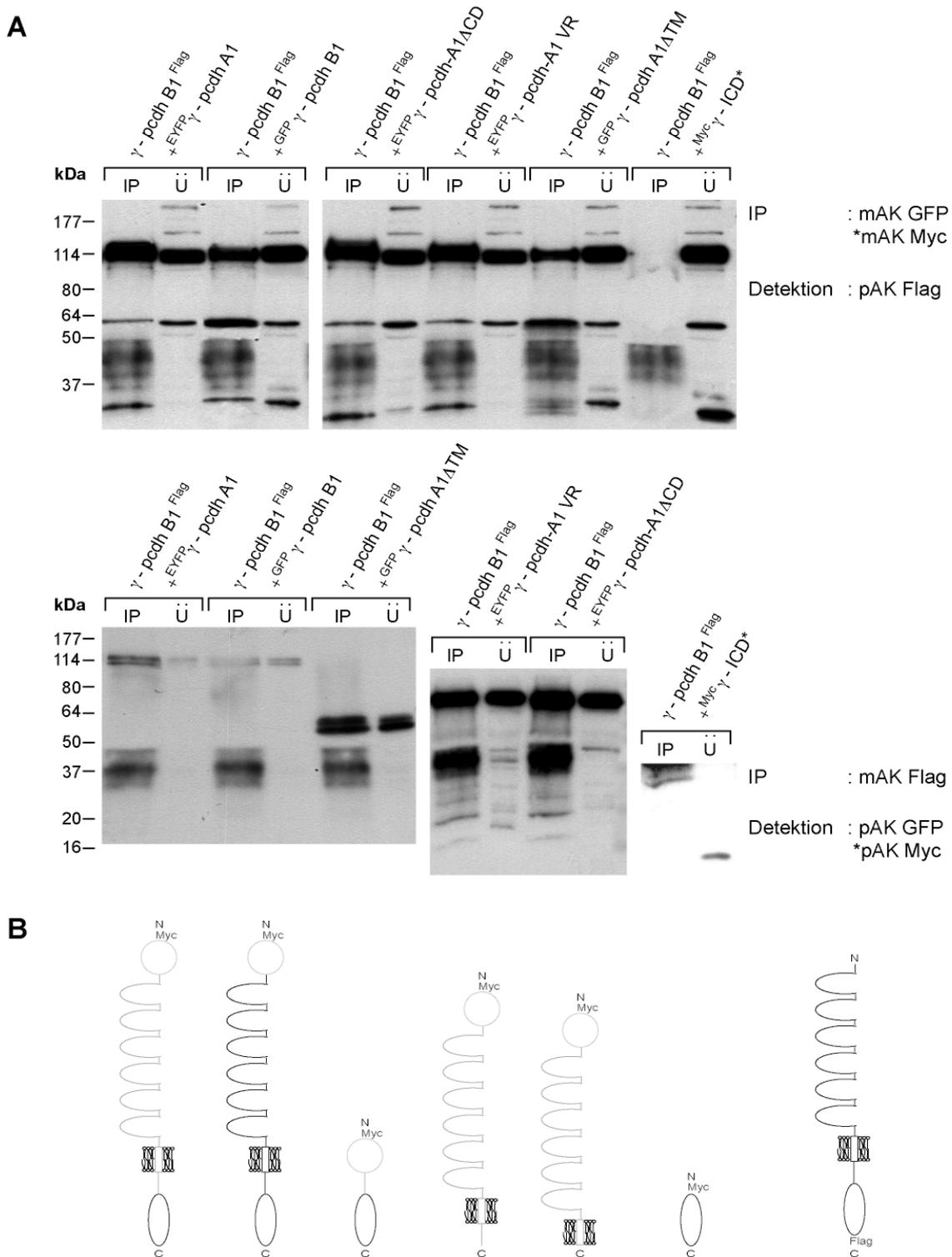
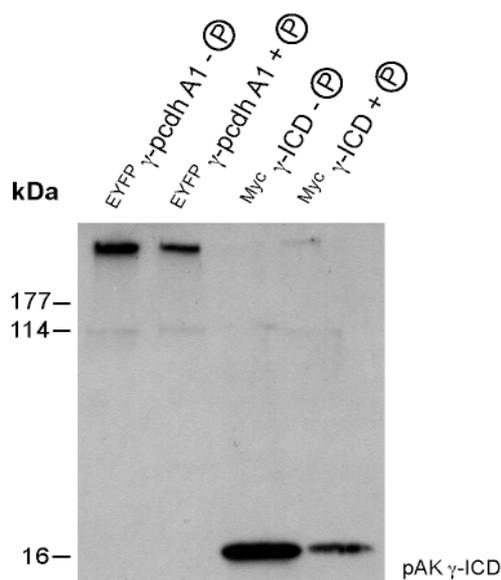


Abbildung 2.4.1.A.: „Western blot“-Analysen der Koimmunpräzipitationen aus den Proteinlysaten von transient transfizierten COS-1 Kulturen. Die Kotransfektionen erfolgten mit dem <sup>Myc</sup> $\gamma$ -pcdh ICD Vektor, <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$  TM Vektor, <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh  $\Delta$ CD Vektor, <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 VR Vektor, <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 Vektor oder <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh B1 Vektor in Kombination mit dem  $\gamma$ -pcdh B1<sup>Flag</sup> Vektor. Zur Detektion der  $\gamma$ -pcdh Konstrukte aus Überstand und dem gereinigten Gesamtpräzipitat kamen gegen Flag-, Myc- oder GFP-Epitope gerichtete, polyklonale Antikörper zur Anwendung. Die Präzipitation der Proteinkomplexe erfolgte durch, gegen die gleichen Epitope gerichtete, an Protein A-Agarose gekoppelte, monoklonale Antikörper.  
B.: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte.

Identifikation der dabei mit präzipitierten Proteine auf „WBs“ analysiert. Kotransfizierte und mit  $\gamma$ -pcdh B1<sup>Flag</sup> interagierende Konstrukte konnten so mit spezifischen polyklonalen Antikörpern detektiert werden. Zur Verifizierung der Resultate wurde, in umgekehrter Reihenfolge, anschließend aus den Lysaten identisch transfizierter Kulturen zunächst der Interaktor isoliert und das  $\gamma$ -pcdh B1<sup>Flag</sup> Konstrukt mit einem polyklonalen Flag-Antikörper auf „WBs“ nachgewiesen.

Wie aus Abbildung 2.4.1. ersichtlich, konnte über die Interaktionen von  $\gamma$ -pcdh B1<sup>Flag</sup> mit GFP- $\gamma$ -pcdh B1 oder EYFP- $\gamma$ -pcdh A1 gezeigt werden, dass individuelle  $\gamma$ -pcdhs sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit anderen Isoformen des Genklusters bilden können. Durch die Verwendung des EYFP- $\gamma$ -pcdh A1 VR Konstrukts, ein  $\gamma$ -pcdh mit fehlender ICD, konnte ferner demonstriert werden, dass ein eventuell existierendes, bisher nicht nachgewiesenes Genprodukt der  $\gamma$ -pcdh 0-Typ Spleißvariante (analog zu  $\alpha$ -pcdh 0-Typ, siehe Abbildung 1.4.), ebenfalls mit vollständigen Formen des Genklusters wechselwirken kann. Überraschend war dabei, dass die  $\gamma$ -ICD, gemeinsames Merkmal aller konventionell gespleißten Isoformen, offensichtlich nicht bei der Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen beteiligt ist, denn wie sich aus weiteren Testreihen ergab, konnte  $\gamma$ -pcdh B1<sup>Flag</sup> selbst mit unterschiedlichsten Antikörperkombinationen nicht mit der Myc- $\gamma$ -ICD koimmunpräzipitiert werden. Spezifische Wechselwirkungen finden vermutlich hauptsächlich über die EC-Domänen oder die Transmembran-Domäne statt, wie die mehrfach erwähnte Heteromerenbildung von  $\gamma$ -pcdh B1<sup>Flag</sup> und EYFP- $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD demonstrierte. Aus anschließenden Versuchen mit dem GFP- $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM Konstrukt ließ sich aber erkennen, dass auch die 89 zwischen ICD und Transmembran-Domäne liegenden Aminosäuren bei der Vermittlung heterogener  $\gamma$ -pcdh-Dimere beteiligt sind. Die Interaktion von GFP- $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM mit  $\gamma$ -pcdh B1<sup>Flag</sup> lässt sich nämlich ebenfalls mit mehreren Antikörperkombinationen nachweisen. Daraus ergibt sich auch die Möglichkeit, dass GFP- $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM eventuell in dimerer Form in den Kern importiert wird.



**Abbildung 2.4.2.:** „Western blot“-Analysen der Protein-lysate aus transient transfizierten COS-1 Kulturen. Die Lysate wurden vor der Analyse über Phosphoraffinitätssäulen fraktioniert und chemisch quervernetzt. Die Transfektionen erfolgten entweder mit dem EYFP- $\gamma$ -pcdh A1 oder dem Myc- $\gamma$ -pcdh ICD Vektor. Zur spezifischen Detektion der  $\gamma$ -pcdhs aus dem chemisch quervernetzten Gesamtansatz kam der gegen die  $\gamma$ -ICD gerichtete Antikörper zur Anwendung.

Um den aus Koimmunpräzipitationen erhaltenen Befund, dass die <sup>Myc</sup>γ-ICD nicht zur Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen befähigt ist, zu überprüfen, wurden entweder mit dem <sup>Myc</sup>γ-ICD oder mit <sup>EYFP</sup>γ-pcdh A1 transfizierte COS-1 Kulturen zunächst mit einem milderen Detergenz (1% NP40) aufgeschlossen. Damit sollten eventuell vorhandene, schwache Interaktionen geschont werden. Um auch eine Abhängigkeit der Dimerisierung von Phosphorylierungen studieren zu können, wurden die Lysate über Phosphoaffinitätssäulen getrennt. Die so erhaltenen, unterschiedlichen Fraktionen wurden anschließend mit DTSSP chemisch quervernetzt (siehe 4.2.3.3.). Unter nicht reduzierenden Bedingungen und mit dem pAK γ-ICD durchgeführte „WB“-Analysen ergaben (siehe Abbildung 2.4.2.) ebenfalls eine Anreicherung des <sup>EYFP</sup>γ-pcdh A1 Konstrukts bei Molekulargewichten über 350 kDa. Dies zeigt, dass <sup>EYFP</sup>γ-pcdh A1 *in vivo* nicht als Monomer, sondern nur als Bestandteil großer Proteinkomplexe zu finden ist und dass die Wirkung der quervernetzenden Chemikalien quantitativ nahezu vollständig war. Dass die <sup>Myc</sup>γ-ICD im Gegensatz dazu nur ein einziges Signal bei einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa zeigte, darf als Bestätigung der weiter oben erhaltenen Befunde gewertet werden. Ein Einfluss von Phosphorylierungen auf die Dimerisierung der γ-pcdh konnte nicht beobachtet werden.

### 3. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die konditionale Entfernung der invarianten C-terminalen Domäne (ICD) der 22  $\gamma$ -pcdh-Isoformen in der Maus. Aufgrund der stark beeinträchtigten Expression des  $\gamma$ -pcdh<sup>ΔC1</sup>-Allels und seines Vorläufers, des  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allels führt diese Deletion in homozygoten Mäusen zu schweren Motorkoordinationsstörungen und neonataler Sterblichkeit. Dieser Phänotyp entspricht der bereits beschriebenen Deletion des gesamten  $\gamma$ -pcdh-Lokus [46] und unterstreicht die Relevanz der  $\gamma$ -pcdhs für das Überleben der Tiere. Heterozygote Mäuse zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten, aber wie Analysen der Transkript- und Proteinmengen ergaben, ist in heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+ΔC1</sup>-Tieren die Expression des +Allels ebenfalls stark beeinträchtigt. 30% (SD±10) der +Expressionsmengen an  $\gamma$ -pcdh (relativ zur  $\gamma$ -pcdh<sup>+/+</sup>-Transkription) reichen aber offensichtlich zum Überleben der Tiere aus. Eine Möglichkeit die niedrigen Transkriptmengen zu erklären, wäre einen direkten negativen Einfluss des modifizierten Allels auf die Expression des +Allels zu postulieren. Die restlichen Transkripte des deletierten Allels -wovon allerdings nur ~ 10% (SD±10; relativ zur  $\gamma$ -pcdh<sup>+/+</sup>-Transkription) detektiert werden konnten- könnten, beispielsweise aufgrund der genetischen Manipulation, die, für das Spleißen notwendigen Enzyme binden und blockieren, so dass diese für die Reifung der +Transkripte nicht mehr zur Verfügung stehen. Indizien für ein derartiges „Austitrieren durch Substrathemmung“ finden sich allerdings nur für das  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allel. Sowohl in homozygoten als auch in heterozygoten Mäusen akkumuliert hier fehlgespleißte mRNS bei Transkriptgrößen von 7,12 und 21 kb, welche offensichtlich noch die vor dem KR-Exon 2 befindliche *pgk-neo*-Kassette enthält. Eine derartige Substrathemmung könnte u.a. für das Absinken der Expression in den entsprechenden Mäusen verantwortlich sein, doch in heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+ΔC1</sup>-Tieren sind keine vergleichbaren Anhaltspunkte zu finden (siehe Abbildung 2.1.3). Die Substrathemmung der spleißenden Enzyme in manipulierten  $\gamma$ -pcdh-Tieren sollte sich außerdem auch auf die Transkriptmengen der  $\alpha$ -pcdhs niederschlagen. Wie aus Abbildung 2.1.3. ersichtlich, bleiben diese aber unverändert. Eine ähnliche Möglichkeit die niedrige Expression der  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup> und  $\gamma$ -pcdh<sup>ΔC1</sup>-Allele zu erklären, ist eine Spleißhemmung der Primärtranskripte. Dabei kann die hnRNS aufgrund der genetischen Manipulation größten Teils nicht oder nur unvollständig gespleißt werden und akkumuliert im Zellkern. Sie könnte folglich nicht translatiert werden und wäre mit Transkriptlängen von >20 kb auch nicht mehr auf „Northern blots“ in Abbildung 2.1.3. detektierbar. Wie es in heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+ΔC1</sup>-Tieren zu einer Reduktion der +Expressionsmengen auf 30% (SD±10; relativ zur  $\gamma$ -pcdh<sup>+/+</sup>-Transkription) kommt, bleibt dabei allerdings ungeklärt.

Die These, dass in heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+ΔC1</sup>-Tieren zum Erreichen der vollen Expressionsmengen des +Allels ein ausreichend großer Anteil an ICD enthaltendem  $\gamma$ -pcdh hätte vorhanden sein müssen (siehe 2.2.2.), die  $\gamma$ -pcdhs also ihre eigene Expression steigern können, schien ebenfalls eine plausible Erklärung für das beobachtete Abfallen der +Expression zu sein. Bei dieser Funktion der  $\gamma$ -ICD könnte es sich einerseits um eine Stabilisierung der  $\gamma$ -pcdh-Transkripte im Zytosol, andererseits um eine genregulatorische

Steigerung der  $\gamma$ -pcdh-Lokusexpression im Zellkern handeln. Da heterozygote  $\gamma$ -pcdh<sup>+/<sup>NEO</sup>-Mäuse aber ca. 60% (SD±10; relativ zur +Transkription) aufwiesen, schien es verwunderlich, dass sich, zur Transkriptionsmenge des –analog zur heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+/<sup>AC1</sup>-Maus- als beeinträchtigt postulierten +Allels, vom  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allel plötzlich nicht mehr ~ 5%, wie in  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO/NEO</sup>-Tieren beobachtet, sondern ca. 30% zur Gesamtexpressionsmenge addieren sollten. Wahrscheinlicher schien, dass hier keine Beeinträchtigung des +Allels vorlag, sondern dass in diesen Tieren die vom  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allel stammenden, geringen Mengen intakten  $\gamma$ -pcdhs offenbar stimulierend auf die Expression des +Allels wirken, so dass dessen Beitrag wieder ~ 50% erreichen konnte. Die Verdopplung der Expression durch die vom  $\gamma$ -pcdh<sup>NEO</sup>-Allel stammenden ~ 5% intakten  $\gamma$ -pcdhs spiegelt dabei eher einen exponentiellen, als einen linearen Effekt wieder. Dies sprach (aufgrund der amplifizierenden Natur der Transkription) eher für eine genregulatorische Funktion der  $\gamma$ -ICD, als für eine mRNA-Stabilisierung. Für heterozygote  $\gamma$ -pcdh<sup>+/<sup>AC1</sup>-Tiere würde das bedeuten, dass ein nur unzureichend großer Anteil an ICD enthaltendem  $\gamma$ -pcdh stimulierend auf die Transkription des eigenen Locus wirkt, welcher zum Erreichen der vollen Transkriptmengen des +Allels nicht ausreicht. Das starke Signal der  $\gamma$ -ICD in den Kernen von kortikalen und hippocampalen murinen Neuronen bekräftigte diese Vermutung, so dass diese Hypothese weiter untersucht wurde.</sup></sup></sup>

Antikörperfärbungen in transfizierten Zellkulturen wiesen zunächst ebenfalls das starke, in murinen Neuronen beobachtete, Kernsignal auf. Zwar formierten sich die N-terminal fluoreszenzmarkierten  $\gamma$ -pcdh-Konstrukte an der Zelloberfläche an distinkten Punkten, doch ein großer Teil des  $\gamma$ -ICD-Signals befand sich im Nukleus. Ein abweichendes Bild hingegen zeigte sich in  $\gamma$ -Sekretasekomplex inaktiven PS1/2 defizienten Fibroblasten. Hier blieben die Kerne ungefärbt, die N-terminale Fluoreszenz mit dem C-terminalen Signal im Zytoplasma kolokalisiert. Letztendlich konnte durch Proteinanalysen dieser PS1/2 defizienten Fibroblasten und durch pharmakologisch behandelte, transfizierte COS-1 Kulturen demonstriert werden, dass die  $\gamma$ -pcdhs, ebenso wie die sequenzverwandten E- und N-Cadherine, durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex prozessiert werden. Dem geht eine Spaltung durch extrazelluläre Matrix-Proteasen voraus, wobei ein transmembranständiges 26 kDa-Fragment erzeugt wird. Dieses wird von der  $\gamma$ -Sekretase als Substrat erkannt und zu einem C-terminalen 20 kDa-Fragment prozessiert. Nach der Abgabe in das Zytoplasma wird dieses bei den  $\gamma$ -pcdhs, nicht aber E- und N-Cadherinen, in den Kern importiert.

Die Prozessierung der  $\gamma$ -pcdhs in einer definierten Abfolge von Proteolysesritten und der Kernimport des zytoplasmatischen Fragments sind Charakteristika von RIP und sprechen gegen die Degradation von  $\gamma$ -pcdh im Zuge unspezifischen Abbaus von Typ-I Transmembranproteinen [52]. Gegen RIP spricht hingegen, dass es bislang nicht möglich war die individuelle Induktion der Proteolyse, d.h. eine Regulation der  $\gamma$ -pcdhs durch ein spezifisches Signal experimentell nachzuweisen. Des Weiteren konnte bislang keine  $\gamma$ -pcdh-Mutationen beschrieben werden, welche die Prozessierung durch RIP verhindert und so zu einem durch die  $\gamma$ -ICD vermittelten Funktionsverlust geführt hätte. Letzteres erscheint bei 22

$\gamma$ -pcdh-Isoformen mit jeweils leicht unterschiedlichen Transmembransequenzen und der enorm niedrigen Substratspezifität der  $\gamma$ -Sekretase als problematisch. Viel versprechend hingegen, entsprechende Mutationen ausfindig zu machen, welche *in vivo* mit einem spezifischen Krankheitsbild assoziiert und damit auch funktionell aufschlussreich sind.

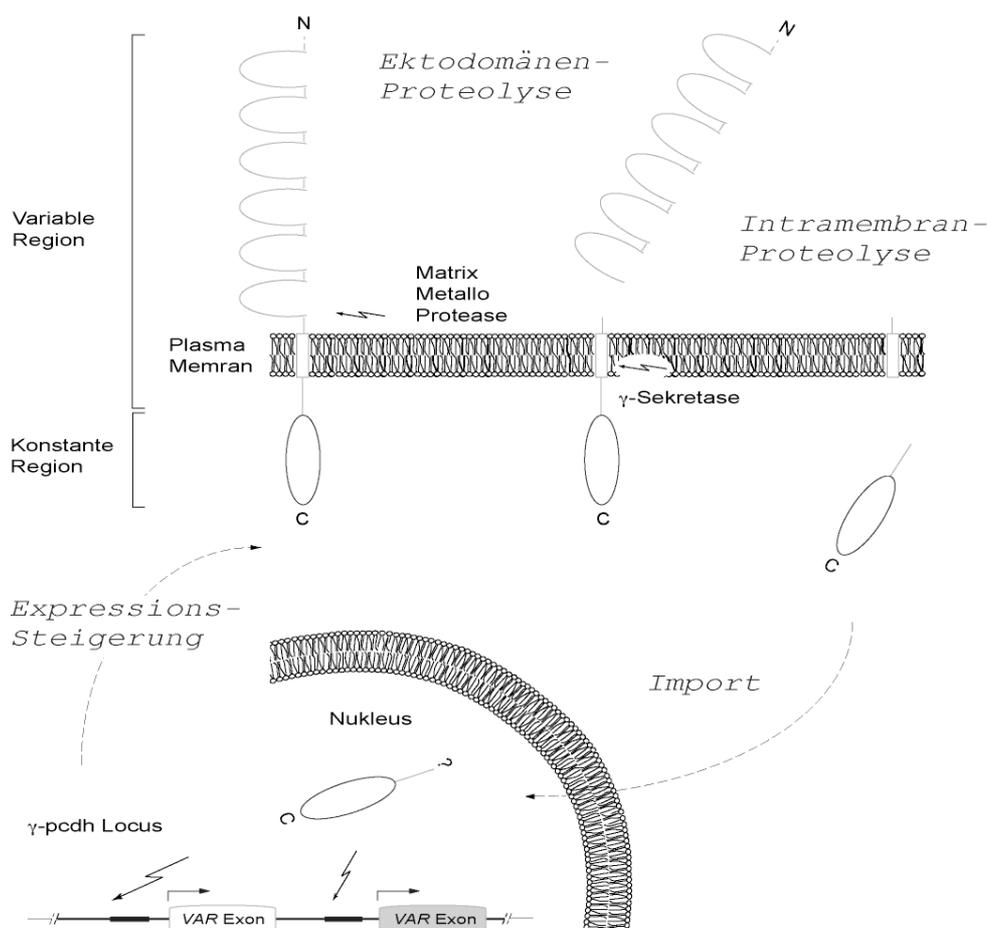
Vorraussetzung für die Charakterisierung und Erzeugung  $\gamma$ -Sekretase-unzugänglicher Mutationen, ist zunächst eine Identifizierung der Proteaseschnittstellen in den Transmembrandomänen der  $\gamma$ -pcdhs. Selbst bei starker, transienter Expression einer einzigen  $\gamma$ -pcdh-Isoform in Zellkultur werden aber auch die verschiedenen, endogen exprimierten Isoformen prozessiert. Daher blieben wiederholte Versuche über Edmann-Sequenzierungen und „ESI-MS/MS“-Analysen das N-terminale Ende des aus <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 erzeugten, zytoplasmatischen 20 kDa-Fragments zu charakterisieren, aufgrund zu geringer Mengen, mangelnder Reinheit des Probenmaterials und zu großer Hintergrundsignale, leider ergebnislos. Dementsprechend war bislang auch keine Aussage über die korrekte Länge des im Kern aktiven, endogenen Fragments möglich. Einerseits konnte zwar durch das <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$  TM- Konstrukt gezeigt werden, dass die im hinteren C-terminalen Bereich der  $\gamma$ -ICD lokalisierte, zweiteilige Kernlokalisationssequenz (siehe Abbildung 2.1.2.) den Import des gesamten zytoplasmatischen Anteils von  $\gamma$ -pcdh A1 vermitteln kann. Andererseits bleibt aber unklar, ob es dort auch wirklich aktiv sein kann. In Transaktivierungstests zeigte das Konstrukt nur eine mäßige, durch den getesteten Promotor hervorgerufene Signalstärke, was vermutlich an der durch das GFP hervorgerufenen, sterischen Behinderung lag.

Im Vergleich dazu rief die  $\gamma$ -ICD in den Transaktivierungstests wesentlich höhere Promotoraktivitäten hervor, weswegen sie wohl als kleinste, aktive Einheit bezeichnet werden darf. In diesen Tests wurde zunächst der zuvor beobachtete Stabilisierungseffekt des <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdhA1  $\Delta$ CD-Konstrukts auf endogenes  $\gamma$ -pcdh-Protein genutzt, um den Anteil endogen erzeugten, zytoplasmatischen Fragments weitgehend zu eliminieren. Damit konnte dessen Beitrag zu den gemessenen Luziferaseaktivitäten vernachlässigt werden und man erhielt basale Transkriptionslevels (siehe Abbildung 2.2.5.). Da allerdings in mit <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdhA1 transfizierten Zellen nur das 2,5 – 3 fache Aktivierungspotential des <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdhA1  $\Delta$ CD- Konstrukts erzielt wurde, ist die Umsatzrate der RIP in den verwendeten HEK-293 Zellen vermutlich eher gering. Letztendlich konnte aus dem direkten Vergleich zwischen in <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$  CD und  $\gamma$ -ICD transfizierten Zellen gemessenen Luziferaseaktivitäten auf verschiedenen  $\gamma$ -pcdh-Promotoren eine 20-25-fache Steigerung der Transkription ermittelt werden.

Die Steigerung der Promotoraktivität durch die  $\gamma$ -ICD ließ sich ebenfalls durch eine 3-4-fache Zunahme der  $\gamma$ -pcdh-Transkriptmengen mittels „Real Time PCR“ und über eine Quantifizierung der spezifischen  $\gamma$ -pcdh-Proteinmengen durch „WBs“-Analysen verfolgen. Interessanterweise war dieser Effekt in PS1/2 defizienten Fibroblasten, in welchen kein Spaltprodukt endogenen Proteins an der Genregulation beteiligt sein konnte, ebenso stark ausgeprägt, wie in HEK-293 Zellen. Damit zeigt sich, dass die  $\gamma$ -ICD auch unabhängig von der RIP agieren kann. Der mit Sicherheit aussagekräftigste Versuch zur Klärung der in den manipulierten Tieren bestehenden Verhältnisse, nämlich die Restauration endogener  $\gamma$ -pcdh-

+Mengen in heterozygoten  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ C1</sup>-Fibroblasten durch Transfektion mit der  $\gamma$ -ICD, scheiterte leider an zu niedrigen Transfektionseffizienzen. Allerdings werfen die bestehenden Beobachtungen die Frage auf, in wie weit sich die Expression der endogenen  $\gamma$ -pcdh<sup>+Mengen</sup> hätte erhöhen lassen können, wenn eine kaum detektierbare  $\gamma$ -ICD bereits Steigerungsraten von 15% erzielt.

Durch die niedrigen Aktivierungspotentiale der <sup>GFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM und <sup>EYFP</sup> $\gamma$ -pcdh A1 Konstrukte konnte leider nicht überzeugend gezeigt werden, dass auch ein durch RIP generiertes, zytoplasmatisches Fragment die Expression endogenen  $\gamma$ -pcdhs erhöhen kann. Um zu beweisen, dass die mit der <sup>Myc</sup> $\gamma$ -ICD erhaltenen Resultate kein Artefakt eines unphysiologischen Proteins, sondern den Effekt der kleinsten aktiven Einheit widerspiegeln, wurden in pharmakologisch behandelten SH-SY5Y Zellen die endogenen  $\gamma$ -pcdh-Mengen analysiert (siehe Abbildung 2.3.8.). Durch die Hemmung des  $\gamma$ -Sekretasekomplex wurde dabei erfolgreich die Erzeugung des zytoplasmatischen  $\gamma$ -pcdh-Fragments unterbunden und damit auch die Expression endogenen  $\gamma$ -pcdhs beeinträchtigt. Daraus folgt, dass auch das zytoplasmatische  $\gamma$ -pcdh-Fragment genregulatorsich aktiv sein muss und dass sich RIP und Expressionsstärke des Genlokus der  $\gamma$ -pcdhs direkt miteinander korrelieren lassen.



**Modell: Die RIP der  $\gamma$ -pcdhs und deren Expressionsstärke lassen sich direkt miteinander korrelieren. Eine erhöhte Prozessierungsrate zieht wiederum erhöhte Substratmengen nach sich. Es entsteht ein Rückkopplungsmechanismus.**

Das Abfallen der +Expression in den  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ C1</sup>-Tieren lässt sich somit dadurch erklären, dass die durch RIP freigesetzte  $\gamma$ -ICD zur Steigerung der endogenen  $\gamma$ -pcdh-Expression notwendig ist. Basale  $\gamma$ -pcdh-Transkriptionsmengen sind offensichtlich zum Überleben nicht ausreichend. Ein direkter negativer Einfluss des modifizierten DNS-Abschnitts auf die Expression des +Allels in der  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ C1</sup>-Maus, lässt sich mit den bisher erhaltenen Befunden allerdings nicht vollkommen ausschließen. Sollte ein derartiger Mechanismus jedoch eine Rolle spielen, so wäre sein geleisteter Beitrag zur  $\gamma$ -ICD vermittelten Transkriptionskontrolle nur additiv.

Bei der Steigerung der Promotoraktivität durch die  $\gamma$ -ICD handelt es sich zunächst um eine rein phänomenologische Beschreibung eines bislang noch unbekanntes Mechanismus. Versuche zur Aufklärung wurden mit der Deletion des ebenfalls evolutionär stark konservierten KSE des A2-Promotors begonnen. Gemäß früheren Beobachtungen [42], senkte eine solche Deletion die Transkriptionsaktivität auf 5% ihres ursprünglichen Wertes. Da das Aktivierungspotential der  $\gamma$ -ICD auf dem KSE-deletierten  $\gamma$ -pcdh-Promotor jedoch kaum beeinträchtigt war (siehe Abbildung 2.2.5.), ist davon auszugehen, dass dieser Sequenzabschnitt entweder überhaupt nicht, oder allenfalls teilweise in die durch die  $\gamma$ -ICD vermittelte Genregulation involviert ist. Die Identifikation der hierbei beteiligten Promotorsequenzen könnte über weitere, gezielte Deletionen oder über so genannte „EMSA“-Analysen, welche auf der veränderten Wanderungsgeschwindigkeit von DNS-Fragmenten nach Proteinbindung basieren, erfolgen. Mit diesem Verfahren könnte eine direkte Interaktion der  $\gamma$ -ICD an definierten Promotorsequenzen detektiert werden. Ein vergleichbares Beispiel findet sich im, für den Transkriptionsfaktor c-Jun vorgeschlagenen „Enhancosom“, bei welchem ebenfalls ein C-terminales Degradationsprodukt von NF $\kappa$ B beteiligt ist [1][43]. Ein weiteres Beispiel für eine direkte, genregulatorische Aktion eines durch Proteolyse entstandenen Proteinfragments findet sich bei der Regulation des TRE-Promotors durch das ebenfalls durch RIP generierte, zytosolische Fragment des Zelladhäsionsproteins CD44 [24]. Die hier beschriebene Transkriptionssteigerung erfolgt jedoch nur unter Beteiligung von CBP oder p300. Eine indirekte Wirkung des  $\gamma$ -ICD, z.B. durch die Entfernung eines „Repressors“, wäre eine weitere Möglichkeit der Genregulation. Ein dem entsprechender, wenn auch gegensätzlich wirkender Mechanismus ist für das zytoplasmatische Fragment von N-Cadherin beschrieben. Dies bindet CBP, führt es so seinem spezifischen Abbau im Proteasom zu und kann damit seine die Transkription steigernde Funktion unterbinden [19].

In diesem Zusammenhang kann die Tatsache, dass das gesamte, ~ 3 kb lange  $\gamma$ -pcdh B1-Promotorkonstrukt in den Transaktivierungstests keine Unterschiede zu der nur 1 kb umfassenden, zum Transkriptionsstart proximalen Variante zeigte, vielleicht als Anhaltspunkt für eine begrenzte Ausdehnung der regulierten Sequenz gewertet werden (siehe Abbildung 2.2.5.).

Weitere Fragen ergeben sich auch aus dem Befund, dass das Aktivierungspotential der  $\gamma$ -ICD zwar für die 4 getesteten Promotoren gleich, aber die einzelnen Promotoraktivitäten in ihren Intensitäten sehr unterschiedlich ausfielen. Die von der spezifischen Methylierung abhängige Aktivität eines Promotors, wie sie für  $\alpha$ -pcdh 6 (siehe 1.2.) beschrieben wurde [42], kann

keinen Einfluss auf die episomalen Reporterkonstrukte haben. Denkbar wäre aber eine Modulation von verschiedenen, unterschiedlich starken, für individuelle  $\gamma$ -pcdh-Promotoren spezifische Transkriptionsfaktoren, durch die  $\gamma$ -ICD. Klärungen dieser Fragen könnten auch Aufschluss über molekulare Mechanismen für ein in distinkten Zelltypen spezifisches  $\gamma$ -pcdh-Expressionsmuster geben.

Die wichtigste Frage zur Aktivierung von Promotorsequenzen ist allerdings, ob möglicherweise auch andere Loci durch die  $\gamma$ -ICD reguliert werden könnten. Da für die verschiedenen durch RIP prozessierten und genregulatorisch aktiven Proteine, wie N-Cadherin [19], CD44 [24], Notch [9], ATF-6 and SREBP [52] mittlerweile entsprechende Zielgene bekannt sind, erscheint dies auch für die  $\gamma$ -pcdhs als durchaus wahrscheinlich. Aufschluss darüber könnte eine systematische Analyse des in  $\gamma$ -pcdh<sup>+/ $\Delta$ Cl</sup>-Tieren von +Tieren abweichenden Genexpressionsmusters liefern. Interessanterweise wurde umgekehrt bisher lediglich für Notch [51], CD44 [24] und die  $\gamma$ -pcdhs (diese Arbeit) eine Regulation des eigenen Lokus beschrieben.

Wie bereits mehrfach ausgeführt, ist das *in vivo* vorkommende, genregulatorisch aktive, zytoplasmatische  $\gamma$ -pcdh-Fragment noch nicht identifiziert. Mäßige Signalstärken des GFP- $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM Modellkonstrukts in Transaktivierungstests wurde auf die sterische Behinderung durch das GFP zurückgeführt, die geringen Signalstärken des EYFP- $\gamma$ -pcdh A1 Konstrukts auf die geringe Prozessierung in HEK-293 Zellen. Wie sich aus Immunpräzipitationen ergab (siehe 2.4.), besitzt GFP- $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM außerdem die Fähigkeit zur Dimerisierung, die Myc- $\gamma$ -ICD jedoch nicht. In diesem Zusammenhang könnte man daher vermuten, dass sich möglicherweise nicht nur die RIP der  $\gamma$ -pcdhs, sondern auch die genregulatorische Aktivität der verschiedenen, zytoplasmatischen  $\gamma$ -pcdh-Fragmente durch Dimerisierung -vielleicht sogar isoformspezifisch- regulieren lässt. So gesehen wären die niedrigen Signalstärken der beiden Konstrukte eventuell auf physiologische Regulationseffekte zurückzuführen. Die Dimerisierung ihrerseits könnte wiederum durch selektive Phosphorylierungen oder Interaktionen mit regulatorisch wirkenden Proteinen gesteuert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte ein GFP- $\gamma$ -pcdhA1  $\Delta$ TM-Konstrukt mit zusätzlich eingefügten oder mutierten Dimerisierungs- und Phosphorylierungsstellen beitragen.

Ein Einfluss der Dimerisierung auf die RIP von  $\gamma$ -pcdh könnte z.B. durch Deletionen der über Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung involvierten RGT-Motive der EC-Domänen oder die Einführung zusätzlicher Schwefelbrücken untersucht werden. Wie bereits für APP beschrieben [34], begünstigt eine, mit der Dimerisierung verbundene Konformationsänderung möglicherweise die Prozessierung der  $\gamma$ -pcdhs. Dabei könnte es sich eventuell auch um das gesuchte, spezifische Signal handeln, welches die RIP der  $\gamma$ -pcdhs induzieren bzw. regulieren kann (siehe oben). Arbeiten über die N-Cadherine eröffnen noch weiter führende Perspektiven, wie auch eine Dimerisierung reguliert sein könnte. Hier führt die Depolarisation von hippocampalen Neuronen zu einem Strukturwandel in eine, die Dimerisierung begünstigende Form [41]. In dieser Konformation sind die N-Cadherine befähigt stark adhärierende, so genannte *trans*-Dimere auszubilden, welche sich wiederum zu reisverschlussartigen

Konglomeraten zusammenlagern. Trotz einer massiven Flächenvergrößerung der Synapse durch die Vesikelfusion nach einer synaptischen Erregung, ist es dadurch einem gewissen Prozentsatz der N-Cadherin-Dimere möglich fest an ihrem Ursprungsort verankert zu bleiben. Der Rest wird quasi aus der Synapse „geschwemmt“. Gesetzt den Fall ein ähnlicher Mechanismus besäße auch Gültigkeit für die Aggregation der  $\gamma$ -pcdhs, so wäre ein fest verankerter, dichter, adhäsive Strukturen ausbildender Anteil unzugänglich für Proteasen, während sich der aus der Synapse „geschwemmte“ Anteil in der dimeren Form prozessieren ließe. Die aus RIP der extrasynaptischen Dimere resultierende Signaltransduktion könnte wiederum über eine Erhöhung der verfügbaren Mengen an  $\gamma$ -pcdh die adhäsive Fläche der  $\gamma$ -pcdhs ausweiten und so zu einer strukturellen Stärkung einer aktiven Synapse führen. Letztendlich wären die  $\gamma$ -pcdhs damit an der Modulation der synaptischen Plastizität beteiligt. Entsprechende Hinweise für einen solchen Mechanismus lassen sich eventuell in Untersuchungen von genetisch manipulierten  $\gamma$ -pcdh<sup>tr/tr</sup>-Mäusen finden [50]. Wie aus der Deletion des gesamten  $\gamma$ -pcdh-Lokus [46] resultieren auch diese C-terminal um 57 Aminosäuren verkürzten Formen sowohl in einer Reduktion der Dichte als auch der Fläche exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen um ca. 50%. Elektrophysiologische Messungen (voltage clamp) in diesen Mäusen resultierten infolge dessen in einer signifikante Reduktion der synaptischen Ströme. Möglicherweise Anzeichen für die strukturelle Instabilität dieser Synapsen. Im Übrigen zeichnen sich auch diese Tiere durch schwere Koordinationsstörungen und neonatale Sterblichkeit aus. Auch die Mengen endogenen  $\gamma$ -pcdhs sind hier stark reduziert, was die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde unterstützt, denn durch die Deletion der 57 C-terminalen Aminosäuren, wurde auch die NLS entfernt. Ein Kernimport des zytoplasmatischen Fragments und eine damit verbundene Anhebung der Pomotoraktivität sollte somit nicht mehr möglich sein. Dies ist vermutlich der Grund für das auch hier beobachtete Abfallen der Expressionsrate endogenen  $\gamma$ -pcdhs.

Eine auffallende Parallele findet sich in der neonatalen Sterblichkeit der verschiedenen  $\gamma$ -pcdh-deletierten und Presenilin-1 defizienten Mäuse [37]. Durch die Entfernung von Presenilin-1 wurde in den entsprechenden Tieren die  $\gamma$ -Sekretaseaktivität stark reduziert. Möglicherweise wurde dadurch auch die Prozessierung der  $\gamma$ -pcdhs so stark vermindert, dass nur noch geringe Mengen zytoplasmatischen Fragments erzeugt werden können. Dies würde wiederum eine, nur unzureichende Stimulation der  $\gamma$ -pcdh-Promotoraktivität mit sich führen, so dass die in diesen Tieren produzierten, endogenen  $\gamma$ -pcdh Mengen nicht mehr genügen deren Überleben zu sichern. Dagegen spricht allerdings, dass sich der für die Presenilin-1 defizienten Tiere erhaltene Phänotyp stark von dem u.a. in dieser Arbeit beschriebenen unterscheidet. Bei den beobachteten Skelettdefekten, dem massiven Verlust von Neuronen und Blutgerinsel, könnte es sich aber auch um, durch unzureichende Prozessierung anderer  $\gamma$ -Sekretasesubstrate verursachte, sekundäre Effekte handeln, welche nicht unbedingt zum lethalen Phänotyp beitragen müssen. Der außerdem für die Vorderhirn spezifische Entfernung von Presenilin-1 gezeigte kortikale Substanzverlust und das in den entsprechenden Tieren beobachtete neurodegenerative Verhalten [5][33] wirft in diesem Zusammenhang interessante Perspektiven zur Beteiligung von  $\gamma$ -pcdh-bedingten Störungen an neurodegenerativen Erkrankungen auf.

Neben der bereits weiter oben diskutierten, möglichen Bedeutung der  $\gamma$ -pcdhs für eine, durch Aktivität induzierte Verstärkung synaptischer Verankerungen, sind natürlich auch noch andere physiologische Funktionen denkbar. Vor allem ein exzessiver Verlust von Interneuronen des Rückenmarks durch Apoptose im späten Stadium der Embryogenese von  $\gamma$ -pcdh defizienten Mäusen ( $\gamma$ -pcdh<sup>del/del</sup>, siehe 1.4.)[46] deutet auf eine die Apoptose hemmende Wirkung der  $\gamma$ -pcdhs hin. Ähnlich den Trk A-Rezeptoren könnte die Expression der  $\gamma$ -pcdhs das Überleben einzelner Populationen gewährleisten, während andere, nicht mehr benötigte Neuronen, gezielt durch Apoptose entfernt werden könnten. Überlegungen in diese Richtungen beinhalten auch, dass die  $\gamma$ -pcdhs durch trophische Faktoren ausgelöste Signale in der Zelle weiterleiten könnten [46]. In weiterführenden Arbeiten wurden deshalb  $\gamma$ -pcdh<sup>del/del</sup> mit BAX<sup>-/-</sup>-Mäusen gekreuzt [50]. Bei BAX handelt es sich um ein proapoptotisch wirkendes Protein der Bcl-Familie, welches u.a. bei der regulierten mitochondrialen Cytochrom C-Ausschüttung beteiligt ist. In den so erhaltenen  $\gamma$ -pcdh<sup>del/del</sup>/BAX<sup>-/-</sup>-Tieren waren zunächst keine phänotypischen Abweichungen von  $\gamma$ -pcdh defizienten Mäusen ( $\gamma$ -pcdh<sup>del/del</sup>) erkennbar. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich aber bei näherer Betrachtung der Interneuronen des Rückenmarks, in denen nur geringe Anzeichen von Apoptose erkennbar waren. Die  $\gamma$ -pcdhs sind offensichtlich in der Lage die durch BAX vermittelte Apoptose zu verhindern, aber Apoptose scheint umgekehrt nicht ursächlich für die Lethalität dieser Mäuse zu sein. Die in Kapitel 2.3.2. dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten hingegen keinen Zusammenhang zwischen Apoptose und Signaltransduktion der  $\gamma$ -pcdhs herstellen. Durch die bereits zuvor in anderen Arbeiten beschriebene, Caspase-3 vermittelte Inaktivierung der  $\gamma$ -Sekretase [6] in der Apoptose, wurde kein genregulatorisch aktives, bei einem Molekulargewicht von 20 kDa akkumulierendes, zytoplasmatisches Fragment mehr erzeugt. Die Zunahme des 26-kDa-Fragments weist lediglich auf eine erhöhte MMP-Aktivität in der Apoptose hin, welche bereits auch für E-Cadherin beobachtet werden konnte [38]. Diese Befunde sprechen gegen die protektive Wirkung der  $\gamma$ -pcdhs in einer späten Phase der Apoptose, in welcher die Caspase-3 bereits aktiviert und eventuell die  $\gamma$ -pcdh involvierenden Mechanismen bereits abgeschaltet wurden. Die vielleicht aus  $\gamma$ -pcdh<sup>del/del</sup>/BAX<sup>-/-</sup>-Tieren ableitbaren, protektiven Mechanismen der  $\gamma$ -pcdh könnten eventuell aber zu einem frühen Zeitpunkt der Apoptose in Kraft treten oder bei der Induktion derselben eine Rolle spielen. Wie diese Mechanismen aussehen und ob dabei vielleicht die Signaltransduktion der  $\gamma$ -pcdhs involviert ist, könnte ebenfalls Aufschluss über die Funktion der  $\gamma$ -pcdh im lebenden Organismus geben.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Besondere Apparate

Luminometer "BioFix Lumi10" (Macherey-Nagel)

Elektroporator "Gene Pulser" (BioRad)

Epifluoreszenzmikroskop "Axioplan" (Zeiss)

RT-PCR "ABI PRISM 7000 Sequence Detection System" (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)

#### 4.1.2. Besondere Software

ImageJ2.1	Densitometrische Signalstärkenbestimmung
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>	Identifikation von Nukleotid- oder Proteinsequenzen
<a href="http://www.expasy.org/prosite/">www.expasy.org/prosite/</a>	Identifikation von funktionellen Strukturmotiven eines Proteins
<a href="http://www.expasy.org/sprot/">www.expasy.org/sprot/</a>	Identifikation von funktionellen Strukturmotiven eines Proteins
<a href="http://www.genome.ucsc.edu">www.genome.ucsc.edu</a>	Analyse der Intron/Exon Struktur einer DNS-Sequenz
<a href="http://www.genomatix.com">www.genomatix.com</a>	Identifikation von Promotor-Sequenzen

#### 4.1.3. Besondere Reagenzien

Brefeldin A [ $\gamma$ ,4-Dihydroxy-2-(6-hydroxy-1-heptenyl)-4-cyclopentanecrotonic-acidyl-lactone] (Sigma)

Caspase-3 Inhibitor II [Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH<sub>2</sub>F] (Calbiochem)

DAPI [4',6-Diamidino-2-phenylindol] (Sigma)

DAPT [N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-Butyl Ester] (Calbiochem)

Gluthation-Sepharose 4B (Pharmacia)

Glyoxal Ladepuffer "8551G" (Ambion)

Hybridisierungspuffer "ULTRAhyb™" (Ambion)

L-685.458 [(1S-Benzyl-4R[1-(1-S-carbamoyl-2-phenethylcarbamoyl)-1S-3-methylbutyl carbamoyl]-2R-hydroxy-5-phenylpentyl)carbamsäure *tert*-butyl ester] (Calbiochem)

Luziferase 5x Zellkulturlysepuffer (Promega)

Luziferasesubstrat [5 mM Käfer-Luziferin, ATP, Mg<sup>2+</sup>, HSCoA] (Promega)

MMLV Reverse Transkriptase (Gibco)

Monensin [2-[5-Ethyltetrahydro-5-[tetrahydro-3-methyl-5-[tetrahydro-6-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-yl]-2-furyl-9-hydroxy-beta-methoxy- $\alpha$ , $\gamma$ ,2,8-tetramethyl-1,6-dioxaspiro[4.5]decane-7-butyricacid] (Sigma)

$\gamma$ -pcdh (invariante C-terminale Domäne)-GST-Fusionsprotein, produziert am 13.08.02 von Eckhard Hofmann (c=0,4 g/l)

Poly(A)Purist™-MAG (Ambion)

Protein A-Agarose "ImmunoPure Plus" (Pierce)

Proteingrößenmarker “Benchmark™” (Invitrogen)  
RNS-Größenmarker 0,24-9,5 kb (Invitrogen)  
Schafserum (Jackson Immuno Research)  
Staurosporin [C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>] (Sigma)  
TAPI [N-(R)-[2-(Hydroxyaminocarbonyl)methyl]-4-methylpentanoyl-L-naphthylalanyl-L-alanine Amid TNF-α Protease Inhibitor-0] (Calbiochem)  
TaqMan™ PCR Core Reagent Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)  
TRIREAGENT™ (Molecular Research Center)

#### 4.1.4. Antiseren

Anti-AFP 3E6, Maus monoklonaler Antikörper (Q-BIOgene)  
Anti-cMyc C19, Kaninchen polyklonaler Antikörper (SantaCruze)  
Anti-cMyc, Maus monoklonaler Antikörper (Sigma)  
Anti-Flag M2, Maus monoklonaler Antikörper (Sigma)  
Anti-Flag, Kaninchen polyklonaler Antikörper (Sigma)  
Anti-GAPDH, Kaninchen polyklonaler Antikörper (Abcam)  
Anti-GFP, Kaninchen polyklonaler Antikörper (MoBiTec)  
Anti-GFP, Maus monoklonaler Antikörper (Roche)  
Anti-α-pcdh ICD, Kaninchen polyklonaler Antikörper (Eurogentech Laboratories)  
Anti-γ-pcdh ICD, Kaninchen polyklonaler Antikörper [A] (Eurogentech Laboratories)  
Anti-Presenilin 1-NT(hum), Kaninchen polyklonaler Antikörper (BioZol)  
Anti-Kaninchen IgG (aus Esel), Meerrettichperoxidase-konjugiert (Amersham Biosciences)  
Anti-Maus IgG (aus Schaf), Meerrettichperoxidase-konjugiert (Amersham Biosciences)  
Anti-Kaninchen IgG (aus Ziege), Alexa Fluor™ 488nm-konjugiert (Molecular Probes)  
Anti-Maus IgG, TexasRed™ -konjugiert (Vector Laboratories)

#### 4.1.5. Zelllinien

R1 ES Zellen: Pluripotente embryonale Stammzellen (ES) aus 129/SVx129/SVj-Mausblastozysten [BW]  
„Feeder“ Zellen: Primäre Maus Fibroblasten aus E13.5 NMRI-Embryonen; mitotisch inaktiv, da mit Mitomycin C behandelt  
COS-1: Nierenzellen der grünen Meerkatze, transformiert mit “SV-40 large T antigen”  
HEK-293: Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit Adenoviren  
PS1/2 defiziente Zellen: Fibroblasten aus Presenilin 1/2 defizienten Mäusen [8], transformiert mit “SV-40 large T antigen” [30]  
SH-SY5Y: Humane Neuroblastomazellen aus dem Knochenmark

#### 4.1.6. Mauslinien

C57B1/6NCrl BR (Charles River)  
Cre-Deleter (Klaus Rajewsky, Köln)

#### 4.1.7. Synthetische Oligonukleotide

A1vr3:	5'-GTCCTAGGTTACTTCTTCTCTTTCTCGCC-3'
A1vr5:	5'-GCCCTAGGGGAAACATCCGATACTCTGTGCC-3'
A2S1:	5'-CCGCTCGAGGAGTTTCTGCAGCGTCGCCAT-3'
A2S2:	5'-GGGGTACCTGTCTCCAATTGGAGAGTTG-3'
A3S1:	5'-CCCTCGAGTTCCTTTTCTGTTTTTTTCCCTCCCCTC-3'
A3S2:	5'-GGGGTACCGTCTGTCTTCATTTCTATTTCTGTG-3'
B1L1:	5'-GCTCCAGCAGGTGGTAATGGC-3'
B1L2:	5'-GCGCCGCAGAACAAAGGCACC-3'
B1S1:	5'-GCTCTAGACTAGCCAAGGGCTCTCTAGTG-3'
B1S2:	5'-GCTCTAGATTACTTCTTCTCTTTCTTGCC-3'
C1SO:	5'-TCTCTGGGCTTGAGAGAAACGCCAGTCAGTGTTGG-3'
C4S1:	5'-CCGCTCGAGCGTGTCTGGGCATTGCTGCCAT-3'
C4S2:	5'-GGGGTACCTACTATGGTGTGAGATGAAGAG-3'
GADCT:	5'-CGCCTAGGTTAAGTCTGGAGCAAGCGTGAGGA-3'
GADEC:	5'-GCCCTAGGTGGTACTCCTCACGCTTGCTC-3'
GADTM:	5'-GCCCTAGGGGCCAGCCTCCTCTGTCCACC-3'
GASAvr2:	5'-CGCCTAGGTTACAAATTTACCTGAGAAAATATTTCCCTC-3'
GB1FI:	5'-ACGCGTCGACTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCATCTTCT TCTCTTTCTTGCCCGA-3'
GB1XF:	5'-GCTCTAGACTAGCCAAGGGCTCTCTAGTG-3'
GB1XR:	5'-GCTCTAGATTACTTCTTCTCTTTCTTGCC-3'
GC2:	5'-GCCGCTGATGGGAGCTCCACT-3'
GOC2:	5'-GGCAGAGGCCAAGATCATGGCTTGCAGCATCTCTGTATCAAAC TGGTTGTTGGG-3'
GV3:	5'-GCCA(AC)(GT)GCCACCACCAGGTA(GCT) -3'
GV5:	5'- (CT)CT(AGC)GT(AGC)ACCAA(AG)GTGGT(AG)GC-3'
GX1:	5'-GCTCTAGAACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATC TGCAAGCCCCGCCAACACTGAC-3'
GX2:	5'-GCTCTAGATTACTTCTTCTCTTTCTTGCC-3'
GX2T1:	5'-GCTCTAGATTAGTTGCCATTACCACCTGCTGG-3'
MH127:	5'-CGCGGATCCAGAAAACCTTCGAGCTCTGAGC-3'
MH70:	5'-CGCGAATTCTGGGAACCGTTTGTGTTTGGTC-3'
NEO4:	5'-GGCTATTCGGCTATGACTGGGC-3'
NEO5:	5'-CAGGACATAGCGTTGGCTACCC-3'
PBTG1:	5'-CGGAATTCCTCAAGCCCCGCCAACACGGAC-3'
PBTG2:	5'-CGGAATTCCTTACTTCTTCTCCTTCTTGCC-3'
PCGB1:	5'-CCGCTCGAGATGGAAAATCAGGTATTGCTTC-3'
XKAR:	5'-GCTCTAGATCACTGGTCACTGTTGTCCGT-3'
XKMAF:	5'-GCTCTAGAACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCT GCCCCGGCAGCCCAACCCTGAC-3'

(MWG-Biotech AG)

FP-GFP: 5'-TCGGCCACAAGTTGGAATACA-3'  
 FP-3'UTR: 5'-GCTGGATTTAGGGAGGGCA-3'  
 GAPDH Primer und Sonde: (assay on demand)  
 GFP-Sonde: 6-FAM-5'-CTATAACTCCCACAATGTG-3'  
 3'UTR-Sonde: VIC -5'-TTGCTACCAAGCCTCTT-3'  
 RP-GFP: 5'-TGCTTGTCGGCCATGATGT-3'  
 RP-3'UTR: 5'-TCCCCAGGGCGTTGG-3'

(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)

Hexanukleotide  
 pd(N)<sub>6</sub>-Hexanukleotid 5'Phosphat Na<sup>+</sup>-Salz

(Roche – Random Primed DNA Labeling Kit)  
 (Amersham Biosciences)

#### 4.1.8. Verwendete Konstrukte

“ploxP NEO-3  $\gamma$ -pcdh CE1-targeting“ Vektor: An eine SacII Restriktionsschnittstelle, welche 450 bp 3' zum  $\gamma$ -pcdh konstanten Exon 1 intronisch lokalisiert ist, wurde die loxP Neo-Kassette des ploxP NEO-3 Vektors, und an die ca. 1 kb 5' zum Exon 1 der konstanten  $\gamma$ -pcdh Region befindliche EcoRV Restriktionsschnittstelle wurde der EcoRV-SacII-loxP-SmaI Adapter plaziert. Zur Transfektion von murinen, embryonalen Stammzellen (siehe 4.2.1.4.) wurde der Vektor an seiner XhoI Restriktionsschnittstelle linearisiert.

Myc  $\gamma$ -pcdh ICD Vektor: Das mit dem Primerpaar GX1 und GX2 produzierte Amplifikat umfasst die Exons 1-3 der konstanten  $\gamma$ -pcdh Region, kodiert damit die N-terminal an die 10 Aminosäuren des c-Myc-Epitops fusionierten 124 Aminosäuren des konservierten  $\gamma$ -pcdh C-terminus und wurde in die XbaI Restriktionsschnittstelle des pRK5 Vektors kloniert.

Myc  $\gamma$ -pcdh ICD $\Delta$ K Vektor: Das mit dem Primerpaar GX1 und GX2T1 produzierte Amplifikat umfasst die Exons 1-3 der konstanten  $\gamma$ -pcdh Region bis bp 2763 (beginnend ab Signalpeptid). Es kodiert damit den N-terminal an die 10 Aminosäuren des c-Myc-Epitops fusionierten, konservierten  $\gamma$ -pcdh C-terminus, ohne den an Lysin reichen Abschnitt (d.h. die letzten 10 Aminosäuren) und wurde in die XbaI Restriktionsschnittstelle des pRK5 kloniert.

Myc  $\alpha$ -pcdh ICD Vektor: Das mit dem Primerpaar XKMAF und XKAR produzierte Amplifikat umfasst die Exonsequenz der konstanten  $\alpha$ -pcdh A-Typ Region, kodiert damit die N-terminal an die 10 Aminosäuren des c-Myc-Epitops fusionierten 151 Aminosäuren der  $\alpha$ -pcdh ICD, A-Typ und wurde in die XbaI Restriktionsschnittstelle des pRK5 Vektors kloniert.

EYFP/ECFP  $\gamma$ -pcdh A1 Vektor: Das mit dem Primerpaar A1vr5 und A1vr3 produzierte Amplifikat umfasst die  $\gamma$ -pcdh A1 Gesamtsequenz und wurde mit seinen AvrII Überhängen in die XbaI Restriktionsschnittstelle 3' im Leseraster zu der bereits im pRK5 vorhandenen CMV-CP3-Signalpeptid-cMyc-EYFP/ECFP (Clontech) Sequenz kloniert. Das Konstrukt kodiert damit das, N-terminal mit cMyc-EYFP/ECFP fusionierte  $\gamma$ -pcdh A1 Protein und weist eine Gesamtlänge von (249+903=) 1152 Aminosäuren auf.

EYFP  $\gamma$ -pcdh A1 VR Vektor: Das mit dem Primerpaar A1vr5 und GASAvr2 produzierte Amplifikat umfasst ausschließlich die Sequenz der variablen Region des  $\gamma$ -pcdhA1 Transkripts und wurde mit seinen AvrII Überhängen in die XbaI Restriktionsschnittstelle 3' im Leseraster zu der bereits im pRK5 vorhandenen CMV-CP3-Signalpeptid-cMyc-EYFP Sequenz kloniert. Das Konstrukt kodiert damit die Aminosäure bis zur Position 810 (beginnend ab Signalpeptid) des  $\gamma$ -pcdh A1 Proteins und wurde N-terminal ebenfalls mit cMyc-EYFP/ECFP fusioniert. Von der Aminosäuresequenz der variablen Region des  $\gamma$ -pcdh A1 Proteins mit konservierter C-terminaler Domäne unterscheidet sich die eventuell in vivo vorkommende kurze Form (0-Typ) durch den Anhang der Aminosäuresequenz V N L.

EYFP  $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ CD Vektor: Das mit dem Primerpaar A1vr5 und GADCT produzierte Amplifikat umfasst die extrazelluläre und transmembrane Region der  $\gamma$ -pcdh A1 Sequenz und wurde mit seinen AvrII Überhängen in die XbaI Restriktionsschnittstelle 3' im Leseraster zu der bereits im pRK5 vorhandenen CMV-CP3-Signalpeptid-cMyc-EYFP Sequenz kloniert. Das Konstrukt kodiert damit (beginnend ab Signalpeptid) bis zur Aminosäure 727 des  $\gamma$ -pcdh A1 Proteins und wurde N-terminal ebenfalls mit cMyc-EYFP fusioniert.

GFP  $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM Vektor: Das mit dem Primerpaar GADTM und A1vr3 produzierte Amplifikat umfasst die gesamte intrazelluläre Region der  $\gamma$ -pcdh A1 Sequenz und wurde mit seinen AvrII Überhängen in die XbaI Restriktionsschnittstelle 3' im Leseraster zu der bereits im pRK5 vorhandenen CMV-CP3-Signalpeptid-cMyc-GFP [58] Sequenz kloniert. Das Konstrukt kodiert damit die Aminosäure 719 (beginnend ab Signalpeptid) bis Ende des  $\gamma$ -pcdh A1 Proteins und wurde N-terminal mit cMyc-GFP fusioniert.

GFP  $\gamma$ -pcdh A1  $\Delta$ TM Vektor: Das mit dem Primerpaar GADEC und A1vr3 produzierte Amplifikat umfasst die gesamte intrazelluläre und transmembrane Region der  $\gamma$ -pcdhA1 Sequenz und wurde mit seinen AvrII Überhängen in die XbaI Restriktionsschnittstelle 3' im Leseraster zu der bereits im pRK5 vorhandenen CMV-CP3-Signalpeptid-cMyc-GFP [58] Sequenz kloniert. Das Konstrukt kodiert damit die Aminosäure 650 (beginnend ab Signalpeptid) bis Ende des  $\gamma$ -pcdh A1 Proteins und wurde N-terminal mit cMyc-GFP fusioniert.

GFP  $\gamma$ -pcdh B1 Vektor: Das mit dem Primerpaar GB1XF und GB1XR produzierte Amplifikat umfasst die  $\gamma$ -pcdh B1 Gesamtsequenz und wurde in die XbaI Restriktionsschnittstelle 3' im Leseraster zu der bereits im pRK5 vorhandenen CMV-CP3-Signalpeptid-cMyc-GFP [58] Sequenz kloniert. Das Konstrukt kodiert damit das, N-terminal mit cMyc-GFP fusionierte  $\gamma$ -pcdh B1 Protein und weist eine Gesamtlänge von (249+890=) 1139 Aminosäuren auf.

$\gamma$ -pcdh B1 Flag Vektor: Das mit dem Primerpaar GB1Fl und PCGB1 produzierte Amplifikat umfasst die  $\gamma$ -pcdhB1 Gesamtsequenz und wurde mit seinen SalI Überhängen in die XbaI Restriktionsschnittstelle des pRK5 Vektors kloniert. Das Konstrukt kodiert damit das C-terminal an ein 9 Aminosäuren langes Flag-Epitop fusionierte  $\gamma$ -pcdh B1 Protein und weist eine Gesamtlänge von 900 Aminosäuren auf.

APP2Z Vektor: Eukaryotischer Transkriptionsvektor; kodiert für das 695 AS umfassende „Amyloid Precursor Protein“, C-terminal fusioniert mit zwei aufeinanderfolgende IgG-Domänen (beschrieben in [48]).

pcDNA3-CD8 Vektor: Die humane CD8 Nukleotidsequenz wurde dem pBST8F11 Vektor von Dan Littmann (NYU) entnommen und zusammen mit einem cMyc-Epitop in den pcDNA3 Vektor kloniert. Das Konstrukt kodiert somit die N-terminal an cMyc fusionierten 189 Aminosäuren des Typ I Transmembranproteins [Information von PD. Dr.Pavel Osten].

pGL3  $\gamma$ -pcdh PA2, pGL3  $\gamma$ -pcdh PA3, pGL3  $\gamma$ -pcdh PC4 Vektoren: Die mit den Primerpaaren A2S1, A2S2 bzw. A3S1, A3S2 bzw. C4S1, C4S2 produzierten Amplifikate umfassen die 1000 bp abmessenden, 5' zur kodierenden Sequenz der entsprechenden variablen  $\gamma$ -pcdh Exons gelegenen, intronischen Abschnitte und wurden über die KpnI und XhoI Restriktionsschnittstellen unidirektional 5' zur Luziferasesequenz in den pGL3 Enhancer Vektor (Promega) kloniert.

pGL3  $\gamma$ -pcdh PA2 $\Delta$ CSE Vektor: Aus dem pGL3  $\gamma$ -pcdh PA2 Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen StuI und Bsu36I das 28 bp umfassende, genau 200 bp 5' zum "ORF" gelegene Konservierte Sequenz Element [42] entfernt und anschließend religiert.

pGL3  $\gamma$ -pcdh PB1s Vektor: Das mit dem Primerpaar B1S1 und B1S2 produzierte Amplifikat umfasst die 1000 bp abmessenden, 5' zur kodierenden Sequenz des variablen  $\gamma$ -pcdh B1 Exons gelegenen, intronischen Abschnitte und wurde über die XbaI Restriktionsschnittstelle, 5' zur Luziferasesequenz in den pGL3 Enhancer Vektor (Promega) kloniert.

pGL3  $\gamma$ -pcdh PB1l Vektor: Das mit dem Primerpaar B1L1 und B1L2 produzierte Amplifikat umfasst die 3 kb abmessenden, 5' zur kodierenden Sequenz des variablen  $\gamma$ -pcdh B1 Exons gelegenen, intronischen Abschnitte und wurde "blunt" über die SmaI Restriktionsschnittstelle, 5' zur Luziferasesequenz in den pGL3 Enhancer Vektor (Promega) kloniert.

0,4pXP1luci Vektor: Umfasst die 400 bp abmessende, 5' zur kodierenden Sequenz des NR2C-Gens gelegene und mit dem Luziferasegen fusionierte Promotorsequenz (beschrieben in [23][39]).

CMVpXP1luci Vektor: Umfasst die 400 bp abmessende und mit dem Luziferasegen fusionierte CMV Promotorsequenz (beschrieben in [23]).

pSV  $\beta$ -Galactosidase Vektor: erhältlich bei Promega

pTR-UF2 Vektor: Eukaryotischer Transkriptionsvektor, kodiert für GFP (nach [58]).

$\gamma$ -VAR Sonde: Das Amplifikat wurde mit dem Primerpaar GV3 und GV5 erzeugt. Die Sequenz umfasst die bp 1780 bis 2110 von  $\gamma$ -pcdh A1, A2 und A3 (beginnend ab Signalpeptid).

Cyclophilin 2 Sonde: Das 252 bp abmessende Amplifikat wurde mit dem Primerpaar MH70 und MH127 erzeugt.

NEO Sonde: Das Amplifikat wurde mit den Primern Neo4 und Neo5 erzeugt und umfaßt die bp 707-1331 der Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase.

$\gamma$ -C1C3 Sonde: Das mit dem Primerpaar PBTG1 und PBTG2 produzierte Amplifikat umfasst die Exons 1-3 der konstanten  $\gamma$ -pcdh Region.

$\gamma$ -C2C3 Sonde: Das mit dem Primerpaar GC2 und PBTG2 produzierte Amplifikat umfasst die Exons 2-3 der konstanten  $\gamma$ -pcdh Region.

$\gamma$ -C1<sup>N37</sup> Sonde: Das Oligonukleotid C1SO hybridisiert auf einer Länge von 37 Nukleotiden mit dem Exon 1 der konstanten Region des  $\gamma$ -pcdh Lokus.

$\gamma$ -C2 Sonde: Das Oligonukleotid GOC2 hybridisiert auf einer Länge von 54 Nukleotiden mit dem Exon 2 der konstanten Region des  $\gamma$ -pcdh Lokus.

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Methoden der Zellkultivierung

#### 4.2.1.1. Kultivierung von Ohrfibroblasten

Fibroblastenmedium:

500 ml	DMEM mit 4,5 g/l Glukose und Pyridoxin/HCl
20%	fötales Kälberserum
100 mg/l	Penicillin/Streptomycin
0,2 M	L-Glutamin

Die Ohren und das umliegende Hautgewebe einer neugeborenen Maus wurden großzügig entfernt, in PBS gewaschen, mit Pinzette und Skalpell fein zerkleinert und 16 h in 2,5 ml Medium mit 1 g/l Kollagenase Ia inkubiert. Nach dem Vereinzeln mittels einer 20 G-Kanüle wurde die Zellsuspension mit 10 ml Medium verdünnt, für 5 min bei 440 g zentrifugiert und das Zellpellet in 3 ml Medium resuspendiert. Die Saat erfolgte auf 35 mm Kulturschalen, ein Mediumwechsel nach 48 h.

#### 4.2.1.2. Kalziumphosphat-Transfektion von Zellkulturen

2x BBS:

50 mM	BES [N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure]
280 mM	NaCl
1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O /NaOH (pH 7,0)

Transfektionsmedium:

500 ml	DMEM mit Earls, ohne Glutamin
10%	fötales Kälberserum
100 mg/l	Penicillin/Streptomycin

Ca. 1 h vor Beginn der Transfektion wurde das Medium von ca. 40-60% konfluenten Zellkulturen entfernt und durch Transfektionsmedium ersetzt. 5-10 µg Plasmid wurden nun in 0,5 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung (250 mM) aufgenommen, 1:1 mit 2xBBS verdünnt, gemischt und für >3 min. bei RT inkubiert. Der Gesamtansatz wurde auf dem Medium über die gesamte Fläche der 96mmØ-Kuturschale verteilt, und für ca. 20 h bei 37°C und 3% CO<sub>2</sub> auf den Zellen inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend mit PBS gewaschen, und mit geeignetem Medium für weitere 12-24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 4.2.1.3. Pharmakologische Behandlung von Zellkulturen

Da sich die effektiven Stoffmengen und Inkubationszeiten jeder Substanz stark voneinander unterscheiden, wurden, aus Gründen der Vergleichbarkeit, verschieden behandelte Kulturschalen eines Experiments zu einem einheitlichen Zeitpunkt, meist 32-48 h nach der Transfektion, geerntet. Der Wirkungsgrad einer Substanz wurde durch den Vergleich mit einer identisch transfizierten und mit dem gleichen Volumen an DMSO für die gleiche Zeit inkubierten Zellkulturschale ermittelt.

Substanz (siehe 4.1.3.)	C <sub>Stocklösung</sub>	Zugabe/6 ml Medium	C <sub>Final</sub>	Inkubationsdauer
DMSO (als Kontrolle)	100%	10-50 µl	-	1,5-25 h
Monensin	10 mM	50 µl	83 µM	25 h
Brefeldin A	35,7 mM	50 µl	0,3 mM	25 h
DAPT (Substanz IX)	5 mM	6-12 µl	5-10 µM	12 h
L-685.458 (Substanz X)	1 mM	42 µl	7 µM	12 h
TAPI	8 mM	30 µl	40 µM	8-10 h
Caspase-3 Inhibitor II	12 mM	40 µl	80 µM	6-8 h
Staurosporin	0,5 mM	6 µl	0,5 µM	1,5-3 h

#### 4.2.1.4. Kultur, Transformation und Selektion von embryonalen Stammzellen

##### Kulturmedium für Stammzellen:

500 ml	DMEM mit 4,5 g/l Glukose
20%	fötales Kälberserum
2 mM	Glutamin
1 mM	Na <sup>+</sup> Pyruvat
0,1 mM	β-Mercaptoethanol
50 mg/l	Penicillin/Streptomycin
1000 U/ml	Leukämie Inhibitionsfaktor

Ca.  $4 \times 10^6$  pluripotente, murine, embryonale Stammzellen (siehe 4.1.5.) wurden nach dem Auftauen auf mitotisch inaktiven, primären, embryonalen Mausfibroblasten (siehe 4.1.5.) für 3 d bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit im Kulturmedium für Stammzellen kultiviert. Zur anschließenden Transformation wurden die Stammzellen in der Mischkultur über die schnellere Adhäsion der Fibroblasten auf Gelatineplatten auf ca. 90% angereichert, für 3 min bei 200 g sedimentiert und in einer Konzentration von  $2,6 \times 10^7$  Zellen/ml in PBS aufgenommen. 500 µl der Zellsuspension wurden mit 100 µl hochreiner, linearisierter und mit PBS gepufferter Vektor DNS (siehe 4.1.8.) der  $c = 0,2-0,3$  g/l gemischt, für 10 min auf Eis gekühlt und bei 240 V, 500 µF, 200 Ω in einer Küvette mit 4 mm Elektrodenspalt elektroporiert. Danach wurde die Suspension noch für 10 min. nachgekühlt, erneut für 2 Tage auf Mausfibroblasten kultiviert, in einer Dichte von  $10^3$  Zellen/96 mm Ø auf mit Gelatine beschichtete Kulturplatten separiert und dort für weitere 8 d in Anwesenheit von 250 mg/l G418 (Neomycinanalogon) kultiviert. Nach der Selektion geeigneter ES Klone unter dem Mikroskop wurden diese jeweils mit Trypsin vereinzelt, aufgeteilt und isoliert expandiert. Ein Teil wurde erneut auf Mausfibroblasten kultiviert, ein Teil mit 250 mg/l Neomycin haltigem Medium auf die homologe Rekombination selektioniert und ein Teil für weitere Analysen der

genomischen DNS verwendet. Richtig rekombinierte Klone wurden bis zur Injektion in C57BL/6-Mausblastozysten in flüssigem Stickstoff gelagert.

Mausblastozysten-Injektion und Embryo-Transfer wurden in der transgenen Einheit des ZMBH von Frank Zimmermann durchgeführt. Die Versuchstiere wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz in dafür vorgesehenen Räumen in der Versuchstierhaltung des ZMBH und im zentralen Tierlabor des MPI gehalten. Die behördliche Zulassung der transgenen Manipulationen erfolgte durch das Regierungspräsidium Tübingen.

#### 4.2.1.5. Immunfärbungen von Zellkulturen

Blockierungslösung:

20 mM	Phosphatpuffer (pH 7,0)
450 mM	NaCl
0,05%	TritonX100
5%	Ziegen Serum

McIlvaine's Puffer (pH 7,0):

18,2 mM	Na <sub>3</sub> Citrat
164 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden auf, mit Fibronectin beschichteten, 1 cm Glasplättchen adhären Zellen kultiviert und gegebenenfalls zur Expression markierter Proteine transfiziert. Das Zellkulturplättchen wurde dann zur Komplexierung der an der Oberfläche der Zelle lokalisierten Proteine direkt mit 100-150 µl Medium, welchem 4 µg/ml Antikörper zugesetzt wurde, überschichtet und in einer geschlossenen Feuchtkammer bei 4°C für 1 h inkubiert. Nach dem vorsichtigen Waschen der Kultur mit PBS wurde diese für 15-20 min mit 1% PFA in PBS fixiert, erneut gewaschen und anschließend zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen für 1 h bei 4°C in Blockierungslösung inkubiert. War ausschließlich die Markierung der Oberflächenproteine beabsichtigt, wurde auf die Permeabilisierung der Membran durch TritonX100 in der Blockierungslösung verzichtet. Zur Komplexierung intrazellulär lokalisierter Proteine wurde die Zellkultur für 1 h bei 4°C mit 1:200 in Blockierungslösung verdünntem Antikörper inkubiert. Identisch wurde nach dem erneuten Waschen mit PBS auch mit dem an ein fluoreszierendes Protein gekoppelten, Spezies spezifischen (sekundären) anti-IgG-Antikörper (siehe 4.1.4.) verfahren. Gegebenenfalls wurde noch, zur Markierung der Zellkerne, doppelsträngige DNS mit DAPI (siehe 4.1.3.) (bildet mit AT, AU und IC fluoreszierende Kluster) komplexiert. Dazu wurde das Kulturplättchen mit McIlvaine's Puffer gewaschen, für 5 min bei 4°C mit 1:100 im gleichen Puffer verdünntem DAPI inkubiert, erneut mit McIlvaine's Puffer und dann mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Kulturplättchen mit Moviol auf einem Objektträger fixiert, getrocknet und mit Klarlack versiegelt. Bei spezifischer Anregung konnten die fluoreszierenden Antigen-Antikörperkomplexe so im Mikroskop untersucht werden.

## 4.2.2. Molekularbiologische Methoden

Die Anwendung nicht aufgeführter, molekularbiologischer Standardmethoden erfolgte nach [31].

### 4.2.2.1. Isolierung von RNS

Eine 96 mm Zellkulturschale oder ca. 0,2 mg Gewebe (z.B. P0 Mausgehirnhemisphäre) wurden mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml TRIreagent™ (siehe 4.1.3.) entweder für 5 min bei RT aufgeschlossen und anschließend abgeschabt oder zuerst im S874 Elveyham-Potter bei 240 rpm und 4°C mit 5-10 Stößen homogenisiert und danach aufgeschlossen. Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform wurde die Emulsion kräftig durchmischt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in 250 µl Isopropanol überführt, um die RNS für mindestens 5 min bei -20°C zu fällen. Nach 8 min. Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm wurde das Pellet 2x mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Über eine PolyT-gekoppelte Festphase konnte anschließend noch PolyA+mRNA angereichert werden (Poly(A)Purist™, siehe 4.1.3.).

### 4.2.2.2. DNase Verdau

#### DNase-Puffer:

10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
50 mM	NaCl
1 mM	DTT

25-50 µg RNS wurden für 1 h bei 37°C mit 20 U RNase freier DNase I und 40 U RNasin in 100 µl Puffer inkubiert. Nach der anschließenden Phenol/Chloroform Extraktion wurde die RNS mit 2 Volumen eiskaltem Ethanol für 15 min bei -20°C präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### 4.2.2.3. „Northern Blotting“ [2]

#### 1x SSC:

150 mM	NaCl
15 mM	Na <sup>+</sup> <sub>3</sub> -Citrat

#### 0,1-2% SSC-Waschpuffer:

0,1-2%	SSC
0,5%	SDS

#### BTPE-Puffer:

10 mM	PIPES
30 mM	BisTris
50 mM	EDTA (pH 8,0)

6-15 µg ungereinigte mRNS oder 0,3-0,8 µg PolyA+mRNS wurden 1:1 in Glyoxalladepuffer (siehe 4.1.3.) verdünnt, für 45 min bei 50°C denaturiert, gekühlt und im 1% Agarosegel mit 4V/cm<sub>Elektrodenabstand</sub> elektrophoretisch getrennt. Über einen Kapillartransfer wurde die mRNS auf eine Nylonmembran übertragen, dort durch UV-Strahlung fixiert, nach 2-4 h Präinkubation bei 42°C in Hybridisierungspuffer (siehe 4.1.3.) mit 1,2x10<sup>7</sup> cpm an <sup>32</sup>P-markierter Sonde versetzt (siehe 4.1.3.) und 16 h bei 42°C bewegt. Die Membran wurde

mehrmals bei 55-68°C mit Waschlösungen absteigender SSC-Konzentrationen gewaschen und bei -70°C 6-48 h auf einem Röntgenfilm exponiert.

Bei der Sondenmarkierung wurden mit der Kleenow DNS Polymerase für 1h bei 37°C, am denaturierten Templat, mit Hexanukleotiden „geprimete“ und <sup>32</sup>P-CTP-markierte Amplifikate erzeugt, welche, nach der anschließenden Reinigung durch Polyacrylamidsäulen und der Denaturierung, auf der Membran hybridisiert wurden. Synthetische Oligonucleotide (siehe 4.1.8.) hingegen wurden für 1 h bei 37°C, mittels der T4-Phosphonukleotidkinase an ihrem 3' Ende mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP markiert und vor der Hybridisierung auf der Membran ebenfalls gereinigt und denaturiert.

#### 4.2.2.4. Reverse Transkription

##### RT-Puffer:

50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
75 mM	KCl
3 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	DTT

5-10 µg RNS wurde mit 2 µg pd(N)<sub>6</sub>-Hexanukleotid 5'Phosphat (siehe 4.1.3.) in einem Volumen von 20 µl für 5 min bei 80°C denaturiert und abgekühlt. Die Reaktion fand dann nach Zugabe von Puffer, 20 U RNAsin, 60 nmol dNTP's und 200 U MMLV Reverse Transkriptase (siehe 4.1.3.) für 1 h bei 37°C statt und wurde durch kurzes Kochen bei 95°C gestoppt.

#### 4.2.2.5. cDNS-Quantifizierung durch "Real Time PCR"

Beim TaqMan™ PCR-System (siehe 4.1.3. und 4.1.7.) wird bei jedem Amplifikationszyklus durch die 5'Exonukleaseaktivität der verwendeten Polymerase, ein Fluorophor von einer, auf der Templatsequenz zwischen dem Primerpaar lokalisierten Hybridisierungssonde abgespalten. Die Anregung des so freigesetzten Fluorophors wird nun nicht mehr von einem ebenfalls an die Hybridisierungssonde gebundenen „Quencher“ absorbiert, sondern kann als direkt zur Entstehung des Amplifikats proportionale Fluoreszenz detektiert und quantifiziert werden. Jede Sonde wurde als Doppelbestimmung mit 0,5-2,5 µg cDNS in einem Reaktionsvolumen von 23 µl vermessen und die Menge des vorhandenen Templats mit Hilfe der Geradengleichung einer Eichgerade berechnet. Die so bestimmte Menge an  $\gamma$ -pcdh 3'UTR-Sequenz wurde anschließend noch mit Hilfe der ebenfalls über RT-PCR bestimmten Mengen an GAPDH Templat und gegebenenfalls GFP Templat normalisiert. GFP (siehe 4.1.8.) wurde, zur Ermittlung der Transfektionseffizienz in transient exprimierenden Zellkulturen verwendet.

### 4.2.3. Proteinanalyse

#### 4.2.3.1. Zellyse

##### Lysepuffer 1:

25 mM HEPES Puffer (pH 7,4)  
1:10 Complete Protease Inhibitor

##### Lysepuffer 2:

25 mM HEPES Puffer (pH 7,4)  
300 mM NaCl  
2% Triton X 100

##### (0,2%) TritonX100-Waschpuffer:

25 mM HEPES Puffer (pH 7,4)  
150 mM NaCl  
0,2% Triton X 100

##### (1%) Triton X100 Standard Lysepuffer:

25 mM HEPES Puffer (pH 7,4)  
150 mM NaCl  
1% Triton X100  
1:10 Complete Protease Inhibitor

Gewebsproteinlyse: Ca. 1 mg Gewebe (z.B. adultes Mausgehirn) wurde in 1,5-2 ml eiskaltem Lysepuffer 1 gegeben und im S874 Elveyham-Potter bei 240 rpm und 4°C mit 5-10 Stößen homogenisiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis und einer anschließenden Zentrifugation für 5 min bei 2.000 rpm wurde der Überstand 1:1 in Lysepuffer 2 verdünnt und 30 min bei 4°C bewegt. Die Debris wurde für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C entfernt und der Überstand zur Analyse in (0,2%) TritonX100-Waschpuffer verdünnt.

Kulturproteinlyse: Nach dem zweimaligen Waschen mit eiskaltem PBS, wurden die Zellkulturen für ca. 2 min mit 200-400 µl (1%) TritonX100 Standard Lysepuffer auf Eis inkubiert, von der 96 mm Kulturschale geschabt und anschließend für 30 min bei 4°C bewegt. Die Debris wurde danach für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C entfernt und der Überstand zur Analyse in (0,2%) TritonX100-Waschpuffer verdünnt.

#### 4.2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

##### Bradford-Reagenz :

0,125 g/l Coomassie Blue G  
6,25% Methanol.  
10,6%  $H_3PO_4$  (pH 1,1)

Bei dieser kolorimetrischen Bestimmung wird die unprotonierte, blaue Form des Coomassie-Farbstoffs durch das zugegebene Protein stabilisiert und aus dem Gleichgewicht zur roten und grünen Form entfernt. Je nach der zu 1 ml Bradford Reagenz gegebenen Proteinmenge, färbt sich die Lösung unterschiedlich stark, so dass deren Absorption bei 595 nm vermessen und gegen eine Eichgerade bekannter Proteinkonzentrationen verglichen werden konnte.

#### 4.2.3.3. Chemische Quervernetzung (Crosslinking)

##### Quervernetzungslösung:

10 mM DTSSP  
5 mM  $Na^+_3$ Citrat

Proteine können mittels DTSSP über die ε-Aminogruppen ihrer Lysine chemisch quervernetzt werden. Hierzu wurden 5 µg, in 1,6 mM CHAPS Puffer gelöstes Protein 1:10 mit Quervernetzungslösung versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Mit der Zugabe von 0,1 M

Tris/HCl (pH 7,5) wurde die Reaktion beendet. Bei der Aufarbeitung zur anschließenden WB-Analyse wurde der Reaktionsansatz bei lediglich 55°C mit 3xProbenpuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol (siehe 4.2.3.6.) denaturiert, um die beim „Crosslinking“ gebildeten Schwefelbrücken nicht zu reduzieren. Die Ausbeute der Reaktion konnte über die Oligomerisierung von 2  $\mu$ g BSA bestimmt werden.

#### 4.2.3.4. Depletieren von Antikörpern

Zur Identifikation der mit Fremdprotein kreuzreagierenden Signale des pAK  $\gamma$ -ICD wurden 20-50  $\mu$ l Antikörper in ca. 200  $\mu$ l 25 mM HEPES (pH 7,5)/150 mM NaCl aufgenommen, mit 4-20  $\mu$ g Antigen ( $\gamma$ -pcdh ICD)-GST-Fusionsprotein (siehe 4.1.3.) versetzt und für 2 h bei 4°C bewegt. Nach Abtrennung unlöslicher Komplexe bei 13.000 rpm für 10 min wurde der Überstand entweder direkt verwendet oder mit 25  $\mu$ l äquilibrierter Gluthation-Sepharose 4B für 30 min erneut bei 4°C bewegt. Nach der Sedimentation bei 2.000 rpm für 2 min. wurde die Reinigung des Überstandes mit der gleichen Menge Gluthation-Sepharose 4B wiederholt und die so gewonnene depletierte Antikörperlösung für Immundetektionen eingesetzt.

#### 4.2.3.5. Koimmunpräzipitation

0,2-0,4 ml Proteinlysate (siehe 4.2.3.1.) der Konzentration 0,5-2,0 g/l wurden mit 20  $\mu$ l Protein A-Agarose bei 4°C für 1 h bewegt und, um unspezifisch an die Protein A-Agarose gebundene Proteine zu entfernen, anschließend bei 5.000 g sedimentiert. Der so gereinigte Überstand wurde nun mit 2-8  $\mu$ g Antikörper (siehe 4.1.4.) versetzt, zunächst für 12-15 h, und nach der erneuten Zugabe von 20  $\mu$ l Protein A-Agarose noch für weitere 2-4 h bei 4°C bewegt. Der daraus sedimentierte Antigen-Antikörper-Protein A-Agarose Komplex wurde nun 3x mit jeweils 800  $\mu$ l (0,2%) TritonX100-Waschpuffer (siehe 4.2.3.1.) aufgeschlämmt, sedimentiert und zum Schluss für 5 min bei 99°C in 20  $\mu$ l 3xProbenpuffer denaturiert (siehe 4.2.3.6.).

#### 4.2.3.6. Diskontinuierliche SDS-PAA-Gelelektrophorese [16]

##### SDS-Probenpuffer (3x) :

6% (w/v)	SDS
30% (v/v)	Glycerin
0,3% (w/v)	Bromphenolblau/ Na-Salz
10% (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
150 mM	Tris/HCl (pH 6,8)

##### Elektrophoresepuffer :

0,1% (w/v)	SDS
190 mM	Glycin
20 mM	Tris /HCl (pH 6,8)

Vor Beginn der Gelelektrophorese wurden die Proteinproben für 5 min bei 99°C in 3x Probenpuffer denaturiert. Vergleichbare Proteinmengen (0,01-0,1 mg) wurden dann auf 10-15%ige SDS/PAA-Gele im Elektrophoresepuffer gegeben (Herstellung gemäß Tab.18.3 [31]) und bei einer konstanten Spannung von 120 mV entsprechend ihres Molekulargewichts voneinander getrennt.

#### 4.2.3.7. Proteintransfer und Antikörperdetektion (“Immunoblotting”)

##### Transferpuffer :

0,1% (w/v)	SDS
190 mM	Glycin
20 mM	Tris /HCl (pH 6,8)
20% (v/v)	Methanol

##### Waschlösung (TBST) :

20 mM	Tris/HCl (pH 7,6)
1,35 M	NaCl
27 mM	KCl
0,1% (v/v)	Tween 20 (Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat)

##### Blockierungslösung :

5% fettarmes Milchpulver oder Schafserum in der Waschlösung

Vor Beginn des Elektrotransfers von Proteinen aus PA-Gelen wurde die Hydrophobizität der PVDF-Membran im Methanolbad erhöht und sowohl Gel, wie Membran im Transferpuffer äquilibriert. Die Elektrophorese erfolgte nach dem “Tank-blotting”-Verfahren [44] bei einer für ca. 12 -15 h gleichbleibenden Stromstärke von 1,3 mA/cm<sup>2</sup> im Transferpuffer.

Im Anschluß wurde die Membran für mehrere Stunden in Blockierungslösung inkubiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die hochaffine Oberfläche zu minimieren. Sowohl der, gegen das interessierende Antigen gerichtete, als auch der Peroxidase gekoppelte, Spezies spezifische (sekundäre) anti-IgG-Antikörper (siehe 4.1.4.) wurden nacheinander und in variierenden Verdünnungen in Blockierungslösung für 1 h auf der Membran exponiert. Reste von unspezifisch an der Membran haftendem Antikörper wurden durch mehrmaliges Spülen mit Waschlösung entfernt. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte durch Chemiluminiszenz.

#### 4.2.3.8. Entfernung von Protein Komplexen von PVDF Membranen (“Stripping”)

##### Denaturierungslösung :

2% (w/v)	SDS
0,1 M	$\beta$ -Mercaptoethanol
62,5 mM	Tris /HCl (pH 8,0)

Vor einer erneuten Antikörperdetektion wurden alle nicht elektrotransferierten Proteine durch eine 30 min Behandlung in Denaturierungslösung bei 70°C von der Membran entfernt. Rückstände der Denaturierungslösung wurden durch mehrmaliges Spülen mit Waschlösung beseitigt.

#### 4.2.3.9. Luziferasetest

##### Färbelösung :

1 g/l	X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)
5 mM	$K_3Fe(CN)_6$
5 mM	$K_4Fe(CN)_6$
2 mM	$MgCl_2$
	in PBS

Ca.  $4-5 \times 10^5$  mit Luziferasereporter- (1/3 der Gesamt-DNS Menge),  $\beta$ -Galactosidasereporter- (1/20 der Gesamt-DNS Menge), und Aktivatorplasmid (siehe 4.1.8.) transfizierte HEK-293 Zellen wurden 2x mit 1,5 ml PBS gewaschen, in 100  $\mu$ l Luziferase Zellkulturlysepuffer aufgenommen und 10 min bei 4°C, 150.000 g pelletiert. Die Proteinkonzentrationen der Überstände verschiedener Präparationen wurden standardisiert und je 20  $\mu$ l 6:1 mit Luziferasesubstrat versetzt. Jeweils 30 und 45 sec nach Start der Reaktion wurde die Emission, über 10 sec integriert, bei 260 nm im Luminometer gemessen. Der aus beiden Zeiten gemittelte Wert wurde anschließend gegen die Transfektionseffizienz normiert.

Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden gleiche Mengen identisch transfizierter HEK-293 Zellen 2x mit PBS gewaschen und 15 min bei RT in 1% PFA fixiert. Reste von PFA wurden durch wiederholtes waschen entfernt, bevor die Zellen für 12-15 h bei 37°C in 1 ml Färbelösung unter Lichtausschluss inkubiert wurden. Nach dem Auswaschen der Färbelösung konnte so im mikroskopischen Bild aus der Ratio der gefärbten zu ungefärbten Zellen pro Volumeneinheit der Anteil transfizierter Zellen bestimmt werden. Pro Färbung wurden ca. 300-600 Zellen gezählt.

Jeder Transfektionsansatz wurde sowohl für die Bestimmung der Luziferaseaktivität, als auch für die Transfektionseffizienz in Triplets analysiert und zur Verifizierung in seiner Gesamtheit wiederholt.

## 5. Anhang

### 5.1. Abkürzungen

APP	:	Amyloid Precursor Protein
CBP	:	CREB Binding Protein
CFP	:	(Cyan Fluoreszent Protein) cyan fluoreszierendes Protein
CNR	:	Cadherin-ähnlicher Neuronaler Rezeptor
d	:	Tag
Da	:	Dalton
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	:	DiMethylSulfOxid
DNS	:	DesoxyriboNukleinSäure
dNTP	:	DesoxyriboNukleotidTriPhosphat
DTSSP	:	3,3'-DiThiobis[SulfoSuccinimidyl Propionat]
EC	:	Extrazellulär Cadherin-ähnlich
GAPDH	:	Glycerin Aldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	:	(Green Fluoreszent Protein) grün fluoreszierendes Protein
h	:	Stunde
IgG	:	Immunglobulin G
kDa	:	kiloDalton
KR	:	Konstante Region
KSE	:	Konserviertes Sequenz Element
l	:	Liter
mAK	:	monoklonaler AntiKörper
min	:	Minute
PAA	:	PolyAcrylAmid
PAGE	:	PolyAcrylamid GelElektrophorese
pAK	:	polyklonaler AntiKörper
PBS	:	(Phosphor Buffered Saline) Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	:	(Polymerase Chain Reaction) Polymerase Kettenreaktion
PFA	:	ParaFormAldehyd
PVDF	:	Poly-Vinylidin-Fluorid (-Membran)
RNS	:	RiboNukleinSäure
RNAasin	:	RNAse-Inhibitor
RIP	:	Regulierte Intramembran Proteolyse
rpm	:	(rounds per minute) Umdrehungen pro Minute (bezieht sich auf gängige Tischzentrifugen für 1,5-2 ml Reaktionsgefäße)
RT	:	RaumTemperatur
RT-PCR	:	(Real Time) Echtzeit Polymerase Kettenreaktion

SD	:	(Standard Deviation) Standard Abweichung
SDS	:	NatriumDodecylSulfat
SEM	:	(Standard Error Mean) Standard Durchschnittsfehler
SSC	:	(Saline with Sodium Citrate) Na <sub>3</sub> Citrat in Kochsalzlösung
sec	:	Sekunde
TBST	:	(Tris Buffered Saline) Tris gepufferte Kochsalzlösung + Tween
U	:	(Unit) Aktivitätseinheit für Enzyme
VR	:	Variable Region
Wt/+	:	Wildtyp
YFP	:	(Yellow Fluoreszent Protein) gelb fluoreszierendes Protein
ZNS	:	Das Zentrale Nervensystem

## 5.2. Literaturverzeichnis

- [1] Baeuerle PA. "IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control" *Cell*. 1998 Dec 11;95(6):729-31.
- [2] Burnett WV. "Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation" *Biotechniques*. 1997 Apr;22(4):668-71.
- [3] Chomczynski P, Sacchi N. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
- [4] De Strooper B. "Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex" *Neuron*. 2003 Apr 10;38(1):9-12.
- [5] Feng R, Wang H, Wang J, Shrom D, Zeng X, Tsien JZ. "Forebrain degeneration and ventricle enlargement caused by double knockout of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 25;101(21):8162-7.
- [6] Fluhner R, Friedlein A, Haass C, Walter J. "Phosphorylation of presenilin 1 at the caspase recognition site regulates its proteolytic processing and the progression of apoptosis" *J Biol Chem*. 2004 Jan 16;279(3):1585-93.
- [7] Frank M, Kemler R. "Protocadherins" *CurOp Cell Biol*. 2002 Oct;14(5):557-62.
- [8] Herreman A, Hartmann D, Annaert W, Saftig P, Craessaerts K, Serneels L, Umans L, Schrijvers V, Checler F, Vanderstichele H, Baekelandt V, Dressel R, Cupers P, Huylebroeck D, Zwijsen A, Van Leuven F, De Strooper B. "Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency" *Proc Natl Acad Sci*. 1999 Oct 12;96(21):11872-7.
- [9] Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. "Signalling downstream of activated mammalian Notch" *Nature*. 1995 Sep 28;377(6547):355-8.
- [10] Kallenbach S, Khantane S, Carroll P, Gayet O, Alonso S, Henderson CE, Dudley K. "Changes in subcellular distribution of protocadherin gamma proteins accompany maturation of spinal neurons" *J Neurosci Res*. 2003 Jun 1;72(5):549-56.

- [11] Kemler R. "From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion" *Trends Genet.* 1993 Sep;9(9):317-21.
- [12] Kirov G, Georgieva L, Williams N, Nikolov I, Norton N, Toncheva D, O'Donovan M, Owen MJ. "Variation in the protocadherin gamma A gene cluster" *Genomics.* 2003 Oct;82(4):433-40.
- [13] Kohmura N, Senzaki K, Hamada S, Kai N, Yasuda R, Watanabe M, Ishii H, Yasuda M, Mishina M, Yagi T. "Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex" *Neuron.* 1998 Jun;20(6):1137-51.
- [14] Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. "Inducible gene targeting in mice" *Science.* 1995 Sep 8;269(5229):1427-9.
- [15] Kuroda H, Inui M, Sugimoto K, Hayata T, Asashima M. "protocadherin is a mediator of prenotochord cell sorting in *Xenopus*" *Dev Biol.* 2002 Apr 15;244(2):267-77.
- [16] Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- [17] Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):3922-7.
- [18] Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T, Robakis NK. "A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions" *EMBO J.* 2002 Apr 15;21(8):1948-56.
- [19] Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK. "A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations" *Cell.* 2003 Sep 5;114(5):635-45.
- [20] Murata Y, Hamada S, Morishita H, Mutoh T, Yagi T. "Interaction with protocadherin-gamma regulates the cell surface expression of protocadherin-alpha" *J Biol Chem.* 2004 Nov 19;279(47):49508-16.
- [21] Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. "Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization" *Nature.* 1996 Mar 28;380(6572):360-4.
- [22] Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8424-8.
- [23] Nordeen SK. "reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers" *Biotechniques.* 1988 May;6(5):454-8.
- [24] Okamoto I, Kawano Y, Murakami D, Sasayama T, Araki N, Miki T, Wong AJ, Saya H. "Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway" *J Cell Biol.* 2001 Nov 26;155(5):755-62.

- [25] Ozawa M. "Lateral dimerization of the E-cadherin extracellular domain is necessary but not sufficient for adhesive activity" *J Biol Chem.* 2002 May 31;277(22):19600-8.
- [26] Parvathy S, Hussain I, Karran EH, Turner AJ, Hooper NM. "Alzheimer's amyloid precursor protein alpha-secretase is inhibited by hydroxamic acid-based zinc metalloprotease inhibitors: similarities to the angiotensin converting enzyme secretase" *Biochemistry.* 1998 Feb 10;37(6):1680-5.
- [27] Phillips GR, Tanaka H, Frank M, Elste A, Fidler L, Benson DL, Colman DR. "Gamma-protocadherins are targeted to subsets of synapses and intracellular organelles in neurons" *J Neurosci.* 2003 Jun 15;23(12):5096-104.
- [28] Porfiri E, Rubinfeld B, Albert I, Hovanes K, Waterman M, Polakis P. "Induction of a beta-catenin-LEF-1 complex by wnt-1 and transforming mutants of beta-catenin" *Oncogene.* 1997 Dec 4;15(23):2833-9.
- [29] Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F. "Conditional gene targeting" *J Clin Invest.* 1996 Aug 1;98(3):600-3.
- Rajewsky K. "Clonal selection and learning in the antibody system" *Nature.* 1996 Jun 27;381(6585):751-8.
- [30] Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K, Komano H. "Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein" *J Biol Chem.* 2002 Apr 12;277(15):12915-20.
- [31] Sambrook, Fritsch, Maniatis "Molecular Cloning" 2.Edition
- [32] Sano K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, Taketani S, Suzuki S. "Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system" *EMBO J.* 1993 Jun;12(6):2249-56
- [33] Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S, Kelleher RJ 3rd, Kandel ER, Duff K, Kirkwood A, Shen J. "Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration" *Neuron.* 2004 Apr 8;42(1):23-36.
- [34] Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Beher D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G. "Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease" *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33923-9.
- [35] Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain" *Nature.* 1998 May 28;393(6683):382-6.
- [36] Schwenk F, Baron U, Rajewsky K. "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells" *Nucleic Acids Res.* 1995 Dec 25;23(24):5080-1.
- [37] Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S. "Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice" *Cell.* 1997 May 16;89(4):629-39.

- [38] Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. "Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis" *J Biol Chem*. 2001 Feb 16;276(7):4972-80.
- [39] Suchanek B, Seeburg PH, Sprengel R. "Tissue specific control regions of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2C promoter" *Biol Chem*. 1997 Aug;378(8):929-34.
- [40] Sugino H, Hamada S, Yasuda R, Tuji A, Matsuda Y, Fujita M, Yagi T. "Genomic organization of the family of CNR cadherin genes in mice and humans" *Genomics*. 2000 Jan 1;63(1):75-87.
- [41] Tanaka H, Shan W, Phillips GR, Arndt K, Bozdagi O, Shapiro L, Huntley GW, Benson DL, Colman DR. "Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity" *Neuron*. 2000 Jan;25(1):93-107.
- [42] Tasic B, Nabholz CE, Baldwin KK, Kim Y, Rueckert EH, Ribich SA, Cramer P, Wu Q, Axel R, Maniatis T. "Promoter choice determines splice site selection in protocadherin alpha and gamma pre-mRNA splicing" *Mol Cell*. 2002 Jul;10(1):21-33.
- [43] Thanos D, Maniatis T. "Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome" *Cell*. 1995 Dec 29;83(7):1091-100.
- [44] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.
- [45] Vanhalst K, Kools P, Vanden Eynde E, van Roy F. "The human and murine protocadherin-beta one-exon gene families show high evolutionary conservation, despite the difference in gene number" *FEBS Lett*. 2001 Apr 20;495(1-2):120-5.
- [46] Wang X, Weiner JA, Levi S, Craig AM, Bradley A, Sanes JR. "Gamma protocadherins are required for survival of spinal interneurons" *Neuron*. 2002 Dec 5;36(5):843-54.
- [47] Wang X, Su H, Bradley A. "Molecular mechanisms governing Pcdh-gamma gene expression: evidence for a multiple promoter and cis-alternative splicing model" *Genes Dev*. 2002 Aug 1;16(15):1890-905.
- [48] Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G. "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing" *Biochemistry*. 2002 Feb 26;41(8):2825-35.
- [49] Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein" *Cell*. 1989 Apr 7;57(1):115-26.
- [50] Weiner JA, Wang X, Tapia JC, Sanes JR. "protocadherins are required for synaptic development in the spinal cord" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec
- [51] Wilkinson HA, Fitzgerald K, Greenwald I. "Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a *C. elegans* cell fate decision" *Cell*. 1994 Dec 30;79(7):1187-98.

- 
- [52] Wolfe MS, Kopan R. "Intramembrane proteolysis: theme and variations" *Science*. 2004 Aug 20;305(5687):1119-23.
- [53] Wu Q, Maniatis T. "Large exons encoding multiple ectodomains are a characteristic feature of protocadherin genes" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3124-9.
- [54] Wu Q, Maniatis T. "A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes" *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):779-90.
- [55] Wu Q, Zhang T, Cheng JF, Kim Y, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Noonan JP, Zhang MQ, Myers RM, Maniatis T. "DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters" *Genome Res*. 2001 Mar;11(3):389-404.
- [56] Yagi T, Takeichi M. "Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity" *Genes Dev*. 2000 May 15;14(10):1169-80.
- [57] Yamagata K, Andreasson KI, Sugiura H, Maru E, Dominique M, Irie Y, Miki N, Hayashi Y, Yoshioka M, Kaneko K, Kato H, Worley PF. "Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation" *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):19473-1979.
- [58] Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth WW, Guy J, Muzyczka N. "A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells" *J Virol*. 1996 Jul;70(7):4646-54.